



FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

**INGENIERÍA DE BIOCATALIZADORES INMOVILIZADOS DE LIPASAS:
CAPTURA DE AGREGADOS BIMOLECULARES POR TÉCNICAS DE
INMOVILIZACIÓN**

TESIS DOCTORAL

RITA PESTANA MAMEDE

MADRID, 2021



CSIC

**INGENIERÍA DE BIOCATALIZADORES INMOVILIZADOS DE
LIPASAS: CAPTURA DE AGREGADOS BIMOLECULARES POR
TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad
Autónoma de Madrid**

Director: José Manuel Guisán Seijas

Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC; Madrid



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID



**FACULTAD DE
CIENCIAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

Programa de Doctorado en Ciencias de la Alimentación

Madrid, 2012

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de cinco años estudiando en la Universidad Autónoma de Madrid, cuatro me ocupando de la realización de esta Tesis Doctoral, muchas han sido las personas que con su ayuda y atención estuvieran allí para apoyarme en todos los momentos.

Indubitadamente el mayor de los agradecimientos al Director de esta Tesis Doctoral José Manuel Guisan, por permitirme realizar este trabajo en su grupo de investigación dándome la oportunidad de iniciarme en el maravilloso mundo de la investigación, por creer en mí, por sus enseñanzas, su paciencia, disponibilidad, amistad. por motivarme a cada día. Sin su incalculable ayuda esta Tesis no hubiera sido posible. No podría haber sido mejor Director.

A Benevides Pessela mi tutor, por toda su ayuda, disponibilidad y colaboración en la búsqueda del mejor grupo de investigación para la realización de esta Tesis Doctoral. Además de tutor, eres un gran amigo. ¡Gracias!.

A José Carlos Conesa, Director del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP), por todas las facilidades prestadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Un recuerdo a Mari Carmen, Pili y al personal del centro (Mantenimiento, Almacén, Secretaría, Unidad de Apoyo, etc.) por su soporte en el día a día.

A Roberto Monilla, por sus enseñanzas y por toda su ayuda en el laboratorio. A Gloria Fernández, por todos sus conocimientos brindados y su gran disponibilidad.

También, un especial agradecimiento a Mari Carmen Ceinos, por todo cariño, apoyo, comprensión y toda ayuda tanto dentro como fuera del laboratorio

Agradezco al Ministerio de Educación Superior Ciencia Tecnología e Innovación de Angola por la ayuda financiera prestada. Un cariñoso agradecimiento a Profesora Cândida Teixeira, por todo el interés que ha mostrado en nuestra investigación, por toda su amabilidad y su ayuda, por creer en mí y por motivarme a continuar con mi carrera investigadora.

A Lara, Alejandro y Janaina, por todos os grandes momentos en el laboratorio: las risadas, música, noticias, por sus enseñanzas, por brindarme vuestra ayuda principalmente a la hora de trabajar con el HPLC, los días de limpieza y sobre todo por mantener un ambiente agradable de trabajo. Gracias por siempre estar dispuestos a ayudarme, a responder mis dudas y por su apoyo en los momentos más duros.

A todos aquellos que hicieron los días más agradables y en especial aquellos con que compartí despacho y mesa a la hora de comida: Javi, María, Sonia, Sandro, Erick, Malena, Gao, Fran, Pedro, Fredi y Alvaro. Gracias a todos por vuestro cariño y hacer que el día a día haya sido tan grato.

A los compañeros que han trabajado en este grupo de investigación y que ya si han ido con los cuales he compartido momentos buenos, gracias por haber mantenido un bon ambiente de trabajo.

A Honória, por su constante apoyo, conversaciones sobre el estado del país, risas y por los momentos en que compartimos muy buenos momentos durante estos cinco años. A Paulina, gracias por los buenos momentos compartidos juntas en las buenas y en las malas.

Por otra parte, quiero dar las gracias a mi familia. A mis padres in memoria, por ser un ejemplo a seguir en todos los aspectos y por haberme enseñado el valor del esfuerzo y la perseverancia desde pequeña. Si he llegado hasta aquí ha sido gracias a ellos. También quiero agradecer a mis hermanas y hermanos, han estado a mi lado apoyándome en los mejores y peores momentos tanto en mi carrera científica como en mi vida privada. Por último, quiero terminar dando las gracias a Helga por toda la confianza, por animarme a dar siempre lo mejor de mí mismo y por hacer mis días más felices.

Gracias.

RESUMEN

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es estudiar la relación entre las diferentes estrategias de inmovilización de lipasas y las propiedades de los diferentes derivados obtenidos: actividad, estabilidad, selectividad.

Inicialmente observamos que a concentraciones moderadamente altas de lipasas (p.e. 2 mg/mL) las enzimas solubles se encuentran mayoritariamente como agregados bimoleculares de dos estructuras abiertas de la enzima.

A partir de este resultado desarrollamos estrategias para inmovilizar la forma abierta y la forma cerrada de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL). La forma abierta se inmovilizó por adsorción interfacial sobre soportes hidrofóbicos, por adsorción iónica del agregado bimolecular y por inmovilización covalente del agregado bimolecular. La forma cerrada se inmovilizó covalentemente en presencia del surfactante CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio).

Todos los derivados de las formas abiertas eran bastante más estables que el derivado de la forma cerrada. El derivado más interesante (adsorción hidrofóbica más recubrimiento con polialilamina) era 10 veces más activo que la enzima soluble diluida y 1800 veces más estable en experimentos de inactivación térmica.

Diseñamos una nueva estrategia para fijar e inmovilizar selectivamente los agregados bimoleculares de TLL y de otras lipasas (*Cándida antártica* fracción B, *Rhizomucor miehie*, Lecitase). En todos los casos, los derivados de los agregados eran bastante más estables que el derivado de la forma cerrada. El derivado más estable era el de la Lecitase que 100 veces más estable que el derivado de la Lecitasa cerrada.

SUMMARY

The main objective of this Ph.D. Thesis is the study of the relationship between different strategies for immobilization of lipases and the properties of the different derivatives. Firstly, it was observed that, by using moderate or high concentrations of soluble lipases (e.g., 2 mg/mL), the soluble enzymes are mainly forming bimolecular enzyme aggregates of two open structure of the lipases.

From these results, different strategies for the immobilization of the open and closed structure of *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) were developed. The open structure was immobilized by adsorption of the isolated enzyme on hydrophobic supports, by ionic adsorption of the bimolecular aggregate on anionic exchangers and by covalent immobilization of bimolecular aggregates. The closed structure of TLL was immobilized by covalent immobilization of the isolated enzyme in the presence of CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide).

All immobilized derivatives of the open structure of TLL were much more stable than the derivative of the isolated closed enzyme. The most interesting derivative (hydrophobic adsorption plus coating with poly-allyl-amine) was 10 fold more active (intrinsic activity) than the diluted soluble enzyme and 1800 fold more stable in experiments of thermal inactivation.

Finally, a new strategy for selective fixation and immobilization of bimolecular lipase aggregates was developed. TLL and other lipases were studied (*Candida antarctica* fraction B, *Rhizomucor miehei*, Lecitase). In all cases, these derivatives were quite more stable than the derivative of isolated closed enzyme. Bimolecular Lecitase was 100 fold more stable than the isolated closed enzyme.

ABREVIATURAS

AG	Acidos grasos
BCL	Beads crosslinked
CALB	Candida antartica B
CNBr ò BrCN	Agarosa activada con grupos bromuro de cianógeno
CLEAs	crosslinked enzyme aggregates
DEAE	Dietilaminoetil
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DEAE	Dietilaminoetil
DHA	Ácido docohexaenoico
DLS	Dispersión dinámica de luz
DTT	Ditiotreitol
EDC	1-etil-3(dimetilaminopropil)carbodiimida
EPA	Ácido eicosapentaenoico
NaBH₄	Borohidruro de sodio
LC	Lecitasa
PAA	Polialilamina
PEI	Polietilenimina
PEG	Polietilenglicol
pNPB	Paranitrofenol butirato
PUFAS	Ácidos grasos polinsaturados
RML	Rizomucor mehiel
TLL	Thermomyces lanuginosus
UCM	Unión covalente multipuntual

ÍNDICE

RESUMEN -----	i
SUMMARY -----	ii
ABREVIATURAS -----	iii
1. INTRODUCCIÓN -----	1
1.1. Ingeniería enzimática y Química Sostenible-----	1
1.2. Ventajas de las enzimas como catalizadores industriales-----	3
1.3. Limitaciones de las enzimas como catalizadores industriales-----	4
1.4. Mejora de las enzimas por técnicas de inmovilización y post-inmovilización-----	4
1.5. Inmovilización-Estabilización de enzimas sobre soportes porosos pre-existentes---	7
1.6. Técnicas de estabilización adicional de enzimas ya inmovilizadas y estabilizadas	13
1.7. Relevancia das lipasas como catalizadores industriales-----	15
1.8. Características particulares de la estructura de las lipasas para su ingeniería-----	16
2. OBJETIVOS -----	20
3. MATERIALES -----	21
4. MÉTODOS -----	22
4.1. Análisis de proteínas-----	22
4.1.1.Determinación de la concentración de proteínas-----	22
4.2. Determinación de la lipasa inmovilizada soluble-----	22
4.2.1.Cuantitativa. Hidrolisis de paranitrofenol butirato (pNPB)-----	22
4.3. Preparación de soportes-----	23
--	
4.3.1.Preparación de agarosa bromocianógeno (Ag-BrCN)-----	23
4.4. Inmovilización de enzimas-----	24
4.4.1.Generalidades-----	24
4.5. Inmovilización Hidrofóbica-----	25
4.6. Inmovilización Covalente-----	26
4.6.1.Inmovilización en soportes agarosa activados con grupos de bromuro cianógeno (Ag-CNBr) -----	26
4.6.2.Inmovilización multipuntual sobre soportes agarosa activados con grupos glioxil-----	26

4.6.3. Inmovilización sobre soportes de adsorción física mediante intercambio iónico: Ag-polialilamina, Ag-poli(etil)enimina, DEAE Sepharose, Q-Sepharose-----	26
4.7. Técnicas Post-Inmovilización-----	27
4.7.1. Modificación física con polietil(en)imina (PEI)-----	27
4.7.2. Modificación física con polialilamina (PAA)-----	27
4.8. Desorción de lipasas de soportes hidrofóbicos-----	27
4.9. Estudio de la estabilidad de preparaciones enzimáticas-----	27
4.9.1. Inactivaciones térmica de diferentes preparaciones-----	27
4.10. Hidrólisis enzimática de aceite catalizada por lipasas inmovilizadas	28
4.11. Análisis por HPLC-----	28
4.11.1. Cálculo de la selectividad EPA/DHA y Linoleico/ Oleico-----	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	30
5.1. Estudio del estado de agregación de las lipasas de <i>Thermomyces Lanuginosus</i> (TLL)-----	30
5.1.1. Estudio del estado de agregación de las lipasa solubles -----	30
5.1.2. Inmovilización de TLL-----	31
5.1.3. Inmovilización de TLL sobre soportes hidrofóbicos-----	34
5.1.3.1. Recubrimiento de los derivados con polímeros-----	34
5.1.4. Inmovilización covalente a soportes de agarosa activados con bromocianógeno-----	35
5.1.5. Inmovilización de adsorción sobre intercambiadores aniónicos-----	36
5.1.6. Conclusiones-----	39
5.2. Propiedades funcionales de los derivados inmovilizados de TLL-----	39
5.2.1. Hiperactivación de derivados inmovilizados covalentemente por surfactantes (CTAB)-----	40
5.2.2. Temperatura óptima de las formas abiertas y cerrada de TLL-----	42
5.2.3. Curso de inactivación térmica de varios derivados de TLL-----	43
5.2.4. Estabilización del derivado de octil por recubrimiento con PAA-----	44
5.2.5. Derivados de TLL inmovilizados sobre soportes poliméricos-----	45
5.2.6. Derivados de TLL sobre soportes catiónicos superficiales-----	46
5.2.7. Comparación de los derivados obtenidos por intercambio iónico-----	46
5.2.8. Hidrólisis de aceites catalizada por derivados inmovilizados-----	47

5.2.9. Conclusiones-----	48
5.3. Captura de los agregados bimoleculares por técnicas de inmovilización-----	49
5.3.1. Hipótesis de trabajo-----	49
5.3.2. Estabilización y fijación de los agregados bimoleculares por inmovilización espontánea sobre agarosa glioxil-----	50
5.3.3. Inmovilización de la enzima unimolecular en presencia de acetilcisteína como agente estabilizante de bases de Schiff-----	51
5.3.4. Hiperactivación de derivados de TLL con CTAB-----	52
5.3.5. Temperatura óptima de los derivados inmovilizados-----	53
5.3.6. Curso de inactivación térmica de los derivados inmovilizados de TLL---	54
5.3.7. Conclusiones-----	54
5.3.8. Causas de la gran estabilidad de la unión bipuntual-----	55
5.4. Captura de los agregados bimoleculares de lipasas por técnicas de inmovilización -----	56
5.4.1. Hipótesis de trabajo-----	56
5.4.2. Agregados bimoleculares de RML-----	58
5.4.3. Agregados bimoleculares de CALB-----	58
5.4.4. Agregados bimoleculares de LECITASA-----	59
5.4.5. Estabilidad térmica de los agregados bimoleculares-----	60
5.4.6. Conclusiones-----	61
6. CONCLUSIONES-----	62
7. BIBLIOGRAFÍA-----	64

1.INTRODUCCIÓN

1.1. INGENIERÍA ENZIMÁTICA Y QUÍMICA SOSTENIBLE

Actualmente, hay muchos problemas medioambientales por resolver a nivel mundial. La preocupación con las cuestiones ambientales hiciera que los expertos definiesen el concepto de la química verde, también denominada química sostenible u orgánica, para encontrar alternativas a las propuestas por la química tradicional, que en tantas ocasiones representa un peligro a la salud y afectan el equilibrio natural del medio ambiente. Por ello, en diferentes foros de la industria química, los expertos definieran el concepto de la química verde, también denominada química sostenible. En este tipo de química, desde el inicio del diseño y desarrollo de las nuevas sustancias se tiene en cuenta el potencial impacto que representan las fórmulas tradicionales para ofrecer alternativas más saludables y/o sustentables. (Rockström, et al., 2009; Sheldon, 2001; Anastas & Kirchhoff, 2002; Anastas & Eghbali 2010; Bornscheuer, et al., 2012).

Así se ha propuesto los doce principios de la química verde o sostenible que desarrollan los siguientes conceptos:

1. Evitar los residuos siempre será mejor que tener que tratarlos o eliminarlos luego.
2. El producto acabado en los diseños de síntesis ha de incorporar el máximo posible de materiales utilizados durante el proceso.
3. Minimizar la toxicidad en el diseño de los métodos sintéticos debe ser una prioridad. Idealmente no ha de tener ninguna, y en la práctica siempre ha de minimizarse en la medida de lo posible.
4. Preservar la eficacia ha de ser compatible con reducir o eliminar la toxicidad.
5. Uso mínimo de sustancias auxiliares (disolventes, adsorbentes, etc.), siempre optando por las más inocuas.
6. Aplicar procesos a presión y temperatura ambiental con preferencia para lograr la eficiencia energética.
7. Los materiales renovables siempre serán prioritarios.
8. Evitar derivaciones cuando sea posible, como los grupos de bloqueo o, por ejemplo, los pasos de protección y desprotección.
9. Sustituir los reactivos estequiométricos por reactivos catalíticos siempre que se pueda.
10. Diseñar los productos de modo que resulten biodegradables.

11. Vigilar el proceso para evitar que se formen sustancias peligrosas.
12. Reducir el riesgo de accidente también mediante la selección de los procesos y las sustancias.

El término Biocatalysis se refiere a la utilización de enzimas que presentan a menudo una alta quimio-, regio-, y enantio selectividad que las convierte en valiosos catalizadores en el campo de la química sostenible. Las reacciones catalizadas por enzimas normalmente se llevan a cabo suaves como temperatura y pH neutro. La Biocatalysis, también conocida como catálisis enzimática o biotransformación, es el uso de enzimas para catalizar reacciones químicas. La Biocatalysis persigue la aplicación de los enzimas en diferentes áreas de la química siendo alternativa desde hace décadas de los catalizadores químicos (homogéneos y heterogéneos) convencionales (Schmid et al., 2001; Jaeger et al., 1998; Dordick, 1989; Carrea, 2000; Yang, 2005).

El empleo de biocatalizadores conlleva una serie de ventajas sobre los catalizadores metálicos tradicionales (Reis et al., 2009; Kim et al., 2006; Reetz, 2013; Sheldon, 2018; Choi et al., 2015):

1. Son catalizadores eficientes, que son capaces de actuar en intervalos de temperatura y presión moderados, minimizando los costes de producción.
2. Presentan una elevada selectividad, son regio-, quimio- y enantioselectivos; Esto permite que actúen sobre una gran variedad de sustratos.
3. Algunas enzimas (pe., las lipasas) pueden catalizar un extenso abanico de reacciones.
4. Las reacciones enzimáticas cumplen con los principios de la Química Verde, por lo que son muy compatibles con el medio ambiente.
5. Las enzimas pueden ser sobreexpresadas, por lo que hacen de los procesos biotecnológicos procesos económicamente eficientes.

Sin embargo, las enzimas son catalizadores solubles (difíciles de re-usar) y generalmente muy inestables. Por ello, el desarrollo de estrategias de inmovilización estabilización de enzimas constituye un núcleo fundamental de la Ingeniería Enzimática. Nos permite, en un único proceso, transformar un catalizador soluble e inestable en un catalizador heterogéneo y muy robusto (Mateo et al., 2007; Hanefeld et al., 2009; Brady, 2009; Fernandes-Lafuente et al., 1988; Guzik et al., 2014). De este modo podremos lograr:

- a) una reducción en la cantidad de enzima a utilizar,
- b) la prolongación de la vida media de las enzimas en los reactores,

- c) un incremento en la reutilización de la enzima en ciclos industriales. Conseguir esto, supondrá incrementar el número de aplicaciones prácticas de la catálisis enzimática, haciéndolas más operativas a nivel industrial).

En el futuro se prevé, los avances en biología molecular, ingeniería genética darán lugar a enzimas más activas y selectivas, incluso frente a sustratos no naturales. Por otro lado, la unión de enzimas a materiales sólidos basados en la nanotecnología ha transformado los enzimas en catalizadores heterogéneos mejorando su estabilidad (Reetz, 2013; Sheldon & Woodley, 2018).

Todos esos avances han permitido la mejora de biocatalizadores ya existentes y la obtención de nuevos ya que a presión hacia al desarrollo de procesos sostenibles afecta los avances tecnológicos. Recientemente, trabajos se han centrado en el desarrollo de tecnologías para acelerar el tiempo de desarrollo de los bioprocesos.

Se puede decir que el futuro de la Biocatalysis es prometedor, ya que hay un número cada vez mayor de aplicaciones de las enzimas en Biotecnología.

1.2. VENTAJAS DE LAS ENZIMAS COMO CATALIZADORES INDUSTRIALES

Es indiscutible el interés que ha despertado durante las últimas décadas el uso de estos catalizadores en diferentes procesos industriales. En gran medida, gracias a los grandes avances que ha tenido la biotecnología en áreas como la microbiología industrial, biología molecular, ingeniería de proteínas y la ingeniería enzimática. Estas técnicas han centrado su atención en la producción eficiente de biocatalizadores que al mismo tiempo conserven su alta quimio-, regio- y estereoselectividad, mejoren su estabilidad, puedan ser reutilizadas y sean compatibles con tecnologías sustentables y procesos ambientalmente más limpios. En este sentido, un gran avance en la consolidación del uso de enzimas a escala industrial se debe en gran medida a la razón de que:

- Son muy activos en condiciones experimentales muy suaves (pH neutro, temperatura ambiente, presión atmosférica, etc.).
- Específicos modifican un solo sustrato en una mezcla muy compleja, incluso un único isómero en una mezcla racémica.
- Muy selectivos una única modificación de varias posibles en sustratos complejos en todas las áreas de la industria química.

Por todas estas propiedades las enzimas serían muy útiles en todas las áreas de la industria química. Por ejemplo:

- Química Fina y Farmacéutica (síntesis de antibióticos, intermedios farmacéuticos quirales, etc.) (Sheldon, 2005; Bastida et al., 2005; Xue et al., 2012; Peñafiel et al., 2019).
- Química de Alimentos; modificación de un componente (hidrólisis de lactosa en leche, síntesis de aditivos e ingredientes funcionales, etc.) (Di Cosimo et al., 2013; Bankar et al., 2009; Bhosale et al., 1996; Borrelli & Trono, 2015).
- Energía; síntesis de biodiesel (Fukuda et al., 2001; Shimada et al., 2009; Adlercreutz, 2013; Shimada et al., 1999; Fjerbaek et al., 2009; Nouredini et al., 2005; Ranganathan et al., 2008).
- Analítica; biosensores enzimáticos (Wang, 2008, Wang, 2005; Zhou et al., 2009; Gerard, 2002; Shan et al., 2009).

Serían catalizadores ideales para una Química sostenible de procesos químicos complejos.

1.3. LIMITACIONES DE LAS ENZIMAS COMO CATALISADORES INDUSTRIALES

Son catalizadores solubles y generalmente muy inestables y eso complica su masiva implementación como catalizadores industriales. Hay diferentes estrategias para mejorar y estabilizar enzimas:

- Evolución dirigida (Wijma et al., 2014; Morawski et al., 2001; Miyazaki et al., 2006; Strausberg et al., 1995).
- Mutagénesis dirigida (Eijsink et al., 2004; Jeanne et al., 1984; Bryan et al., 1986; Pantoliano et al., 1987).
- Modificación química de enzimas solubles (Iyer, 2008; Klivanov et al., 1983; Stepankova et al., 2013; Ó'Fágáin, 2003).
- Técnicas de Inmovilización y Post- inmovilización.

1.4. MEJORA DE LAS ENZIMAS POR TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN Y POST-INMOVILIZACIÓN

Para el uso de un biocatalizador en un proceso industrial es necesaria previamente la optimización de sus propiedades. Para esto un catalizador estable es utilizado para que pueda ser recuperado del medio y reutilizado, esto permite mejorar las propiedades utilizándose una técnica, que torna

el derivado fácilmente manejable y reutilizable esta técnica es la inmovilización del biocatalizador. La inmovilización consiste en el confinamiento de las enzimas sobre un determinado material insoluble, para dar una forma en la que se puedan conservar las propiedades de la enzima y se pueda recuperar para ser reutilizada (Mateo et al., 2007).

Los derivados inmovilizados y sus propiedades son determinados por las características de la enzima y por las del soporte sobre o cual se inmoviliza. La interacción entre ambas dará lugar a un derivado con propiedades químicas, bioquímicas y mecánicas distintas. Además, en procesos físicos o químicos, tanto la velocidad como el rendimiento de la inmovilización vienen determinados por distintos parámetros: el tipo de soporte, la técnica de inmovilización utilizada, la cantidad de enzima y de grupos reactivos en el soporte, el pH, la temperatura y el tiempo de reacción (Mateo et al., 2007).

a) Estabilización por técnicas de inmovilización

Los distintos métodos de inmovilización se clasifican a menudo según el tipo de interacción físico-química usada en la unión entre el soporte y la enzima. La adsorción sobre soportes iónicos y la inmovilización covalente son, de las técnicas de inmovilización disponibles, las que están presentes en un mayor número de aplicaciones en la industria.

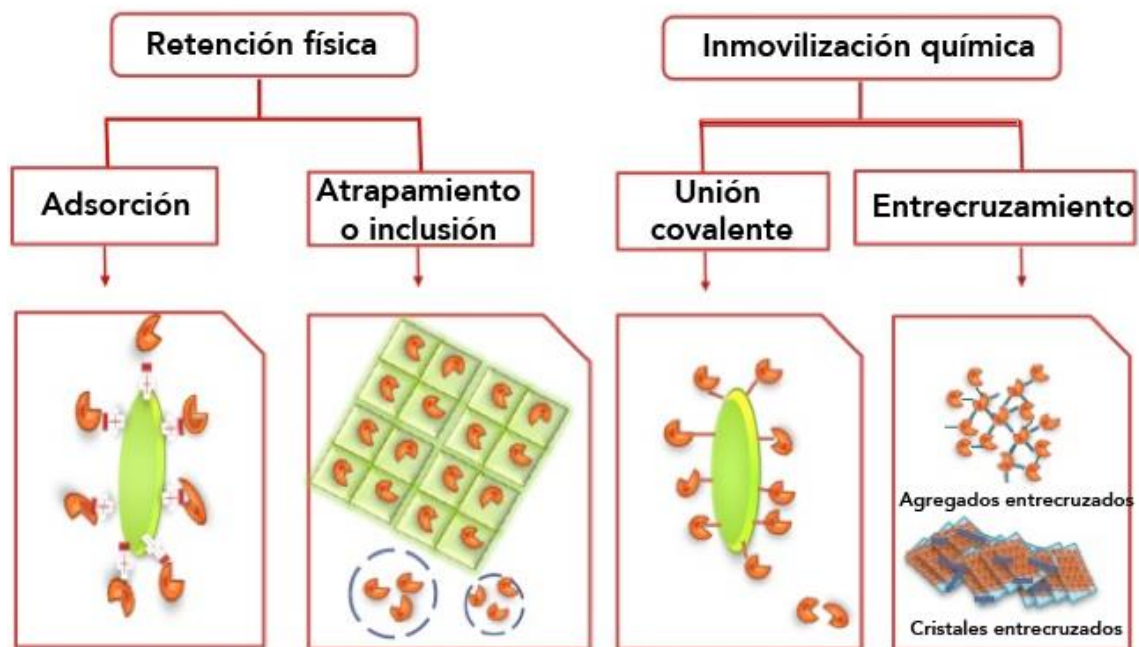


Figura 1.1 - Diferentes métodos de inmovilización de enzimas.

La tabla siguiente presenta las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos de inmovilización:

	Ventajas	Desventajas
Adsorción	<ul style="list-style-type: none"> • Sencillo y barato • Alta reactividad química • Ningún cambio conformacional del biocatalizador • No es necesario utilizar reactivos • Reutilización de material caro 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja estabilidad • Posible pérdida biocatalizador • Las uniones débiles con el soporte pueden causar desorción del mismo
Unión covalente	<ul style="list-style-type: none"> • Unión fuerte • Alta estabilidad al efecto térmico, del pH y solvente orgánico • Fácil acceso del sustrato a la enzima • Previene la elución de biocatalizadores • Flexibilidad en el diseño de material y método de soporte 	<ul style="list-style-type: none"> • El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo • La enzima posee una movilidad limitada, lo que causa una disminución en la actividad • Menos efectivo para la inmovilización de células • Los soportes no son renovables
Atrapamiento	<ul style="list-style-type: none"> • Protección del biocatalizador • Permite el transporte de compuestos de bajo peso molecular • Permite la operación continua debido a la densidad celular mantenida 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitaciones en la transferencia de masa • Baja carga del biocatalizador
Microencapsulación	<ul style="list-style-type: none"> • Proporciona la gran área de superficie entre el material polimérico y la enzima • É posible encapsular simultáneamente una gran variedad de biocatalizadores, llevándose a cabo reacciones que ocurren los múltiples pasos 	<ul style="list-style-type: none"> • Inactivación de la enzima durante la encapsulación

Tabla 1.1 - Ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización.

La importancia de la inmovilización de enzima se debe principalmente a las ventajas que se obtienen con ellas: La inmovilización puede conllevar el incremento de mejora de las propiedades (actividad, estabilidad y selectividad), debido a un mantenimiento de la estructura terciaria de la enzima, sobre todo, en la que están implicados enlaces de tipo irreversible; posibilidad de reutilización del catalizador, no necesidad de separar la enzima de los productos de reacción, mayor versatilidad en elección de reactores y mejora del control de los procesos (Mateo et al., 2007).

1.5. INMOVILIZACIÓN-ESTABILIZACIÓN DE ENZIMAS SOBRE SOPORTES POROSOS PRE-EXISTENTE

Cuando queremos desarrollar estrategias de estabilización de enzimas mediante técnicas de inmovilización, la inmovilización de enzimas sobre soportes porosos pre-existentes es el protocolo de inmovilización más prometedor:

- a. La inmovilización de enzimas, completamente dispersas, en el interior de una estructura porosa protege a la enzima de cualquier proceso de agregación indeseable promovido por codisolventes orgánicos, calor, pH. etc. Además, también protege a la enzima de interacciones indeseables con interfases hidrofóbicas externas (disolventes inmiscibles, aire, oxígeno, etc.).



Estabilización por inmovilización dentro de un sólido poroso

Figura 1.2 - Efecto estabilizante de la inmovilización de enzimas sobre soportes porosos pre-existentes. Las agregaciones son imposibles. No hay interacción con interfases hidrofóbicas externas (disolventes, burbujas de aire, etc.).

- b. La inmovilización de lipasas por adsorción interfacial sobre superficies puede mejorar notablemente su estabilidad tridimensional.

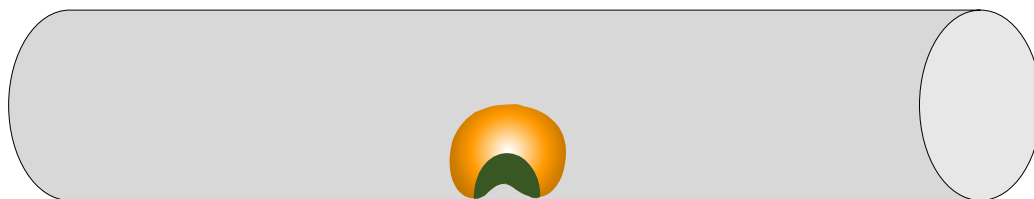


Figura 1.3 - Estabilización de la estructura abierta de lipasa por adsorción interfacial sobre un sólido hidrofóbico.

- c. Las moléculas de enzima inmovilizadas y completamente dispersas pueden estabilizarse por modificación adicional con polímeros.



Figura 1.4 - Estabilización adicional de enzimas inmovilizadas por modificación por polímeros hidrofóbicos.

De este modo, diseñando inmovilizaciones un poco más complejas podemos estabilizar altamente las enzimas y en un único proceso transformamos un biocatalizador soluble y muy inestable en un biocatalizador heterogéneo y altamente estabilizado.

Algunas técnicas de inmovilización-estabilización de enzimas relevantes son las siguientes:

i. Inmovilización covalente multipuntual sobre soportes altamente activados.

Este método de inmovilización supone la unión irreversible entre enzima y soporte. Los enlaces que se forman son fuertes y estables, impidiendo que la enzima se libere al medio de reacción (Guisan, 1988; Mateo et al., 2006, Blanco et al., 1989a; Pedroche, 2007; Blanco et al., 1989b). Para obtener un elevado rendimiento de inmovilización, es importante que los

aminoácidos esenciales para la catálisis no estén involucrados en la unión covalente. Este hecho conduce al reciente interés en lograr la inmovilización orientada de enzimas y de moléculas para lograr que retengan su actividad catalítica o biológica.

La unión se basa en la formación de enlaces resistentes y estables, entre grupos funcionales presente en el soporte y las cadenas laterales de los aminoácidos accesibles de la superficie enzimática (grupos ϵ -NH₂ de las lisinas, -SH de las cisteínas y -OH de las tirosinas y serinas) dando lugar a diversos tipos de enlaces como amida, tio-éter y/o éter, Una inmovilización covalente muy interesante es la inmovilización multipuntual a través de la región más rica en Lys sobre soportes activados con grupos glioxyl. Cuando la inmovilización se hace a pH 10 la enzima se “orienta” por la región más rica en residuos Lys (Guisán,1988; Mateo et al., 2006; Blanco et al.,1989, 1989a; Pedroche, 2007).

La unión covalente a soportes ha permitido en numerosas ocasiones modificar las propiedades de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima soluble, tales como mejorar su eficiencia catalítica (aumento de K_{cat}/K_m) o mejorar su estabilidad frente a agentes distorsionantes (Mateo et al., 2007).

INMOVILIZACION DE LIPASAS SOBRE SOPORTES AGAROSA-GLIOXIL

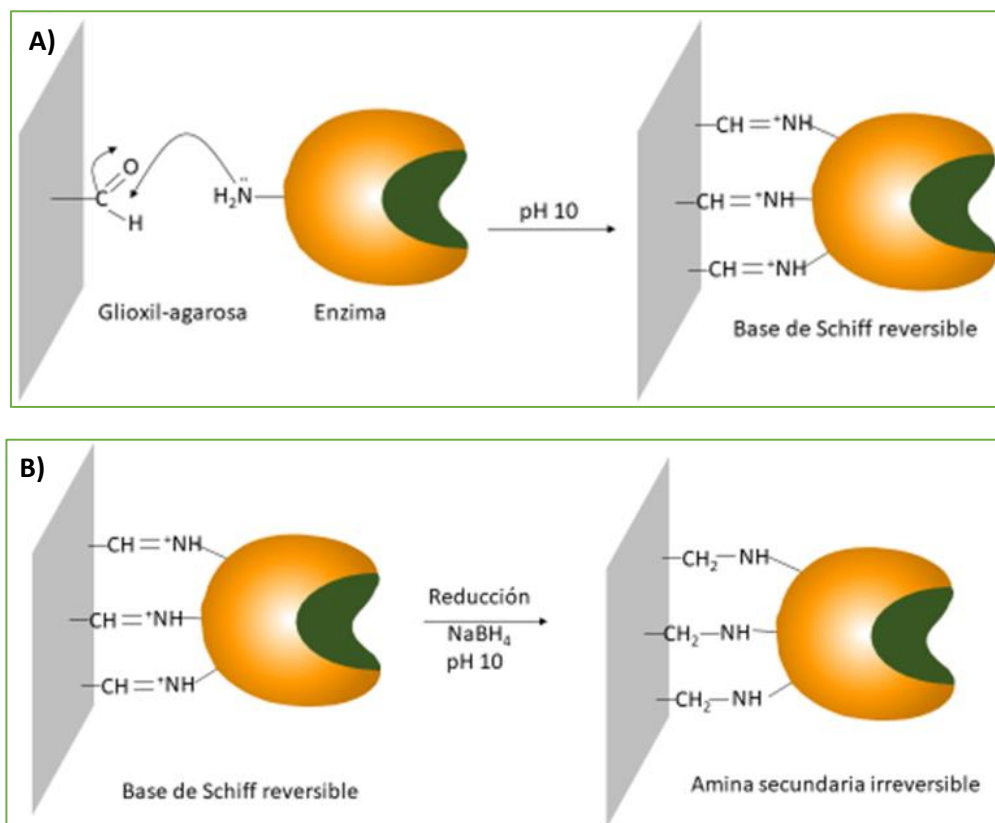


Figura 1.5 - Inmovilización de enzimas (pe., lipasas) por unión covalente multipuntual sobre soportes glioxil-agarosa.

ii. Inmovilización sobre intercambiadores iónicos (p.e. poliméricos)

Las técnicas de pos- inmovilización se presentan como una solución para la estabilización de aquellas subunidades que no hayan quedado ancladas al soporte mediante técnicas de inmovilización. Soportes sólidos recubiertos de polietilenimina o dextrano sulfato. Inmovilizan de un modo reversible las enzimas y generan un ambiente hiper-hidrofílico alrededor de cada molécula de enzima inmovilizada y ello les suele conferir estabilización. La polietilenimina (PEI) es una polialilamina alifática flexible que contiene 25% de grupos amino primario, 50% de grupos amino secundarios y un 25% de grupo amino terciario, ionizados. Los cuales reaccionan con los residuos carboxilos de la superficie de la enzima, generando un ambiente hidrofílico alrededor del

biocatalizador que conduciera potencialmente a una mayor estabilización (Mateo et al., 2000; Palomo et al., 2002; Bahulekar et al., 1991; López-Gallego et al., 2005).

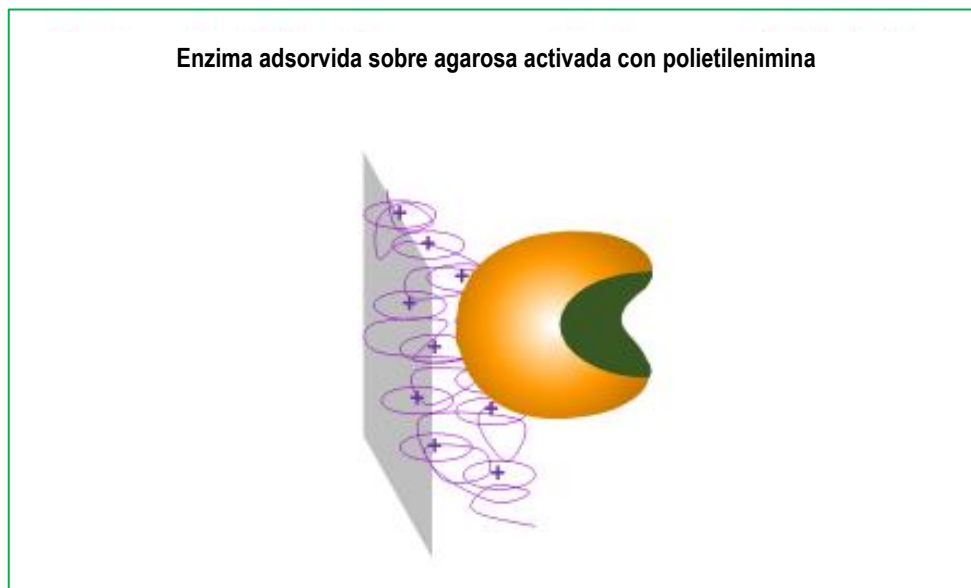


Figura 1.6 - Inmovilización de enzimas sobre soportes poliméricos policationicos (pe., agarosa recubierta de polietilenimina).

iii. Formación de CLEAs (crosslinked enzyme aggregates)

Recientemente se ya desarrollo una nueva clase de enzimas inmovilizadas libres de soporte conocidas como CLEAs. Lo que caracteriza a esta metodología es que a través de una precipitación selectiva se puede alcanzar la purificación y la inmovilización de las enzimas en un solo paso. El uso de CLEAs es un método muy atractivo para la inmovilización de enzimas debido a su simplicidad y a que presenta la posibilidad de utilizar extractos enzimáticos crudos, además, permite la co-inmovilización de diferentes enzimas. (Sheldon, 2000; Sheldon & Van Pelt, 2013; Cao et al., 2000; Schoevaart et al., 2004; Sheldon, 2011; Sheldon, 2007).

La enzima se agrega suavemente con polietilenglicol y luego se entrecruza covalentemente con glutaraldehído. Las moléculas de enzima agregadas (con un intimon contacto entre superficies de varias moléculas) suelen ser bastante más estables que las enzimas aislada.

iv. Inmovilización orientada multipuntual sobre soportes heterofuncionales conteniendo grupos epóxido o grupos glioxil

El soporte glioxil agarosa presenta una multicapa de grupos aldehído, a pH alcalino se produce la inmovilización por unión covalente multipuntual involucrando a los aminos primarios no ionizados de la superficie de la enzima (grupos ϵ -NH₂ de las lisinas) (Mateo et al., 2007).

Los enlaces formados son reducidos de forma que las posiciones relativas de los residuos implicados en la unión covalente multipuntual permanezcan inalterados durante los cambios conformacionales que implicarían la inactivación de la enzima por agentes distorsionantes, permitiendo de esta forma aumentar su estabilidad. La estabilidad de una enzima estabilizada por unión covalente multipuntual a agarosa- glioxil, por norma general, suele ser mayor que la de la enzima soluble y también que la enzima inmovilizada por unión covalente unipuntual (BrCN) (Pessela et al., 2003).

Las principales características de la unión covalente multipuntual sobre soportes activados con grupos glioxil son:

- 1- Buena congruencia geométrica entre el soporte y la enzima.
- 2- La unión unipuntual aldehído-amino (bases de Schiff) es muy débil y reversible, de forma que si una unión introduce una importante distorsión en la estructura tridimensional de la proteína, este enlace pueda romperse.
- 3- Reducción final de las reversibles bases de Schiff a enlaces amino secundarios muy estables utilizando borohidruro, agente adecuado para difundir por el complicado entramado macromolecular formado por la enzima unida multipuntualmente al soporte y que además es capaz de reducir los grupos activos remanentes en el soporte.
- 4- La primera interacción de la enzima con el soporte se produce a través de al menos dos puntos por lo que en este tipo de interacción la enzima se debe auto-orientar hacia el soporte por su zona/s más rica/s en grupos amino reactivos (lisinas). (Pessela et al., 2003; Mateo et al., 2010).

Las variables que se han descrito pueden controlar el grado de multiinteracción entre la enzima y el soporte son:

- a. La temperatura de inmovilización: El uso de temperaturas moderadamente altas podría promover una mayor flexibilidad de la estructura de la proteína, lo que favorecería su reactividad con los grupos del soporte.
- b. El tiempo de inmovilización: De forma que consigamos un correcto alineamiento de las moléculas de enzima y el soporte.
- c. El pH del medio: Importante ya que marca la reactividad de los grupos de la superficie de la proteína (Ej. Lisinas reactivas, tienen un pK de entorno a 10 y son poco reactivas a pH neutro).

La ventaja fundamental de este sistema radica en que tras la reducción de los derivados, la superficie del soporte es sumamente hidrofílica e inerte. Sin embargo, este sistema no cumple todas las características del sistema ideal:

- 1- La necesidad de inmovilizar las enzimas a un pH elevado (pH 10), en el que las enzimas son poco estables.
- 2- El uso de borohidruro en la reducción del enlace tipo base de Schiff, puede representar un problema cuando se trata de cantidades muy grandes de derivado (Ej. preparación a nivel industrial).

Una vez el enzima es inmovilizado la ventaja que tiene es que puede ser más estable, las uniones permanecen invariables frente a las condiciones exteriores, no modificándose más la conformación de la proteína. La longitud de los brazos espaciadores entre la enzima y el soporte también afecta, si estos son cortos la enzima inmovilizada poseerá mayor rigidez de unión y estabilidad.

Así por ejemplo en un soporte en el cual tenemos grupos aldehído activados en la superficie, como es por ejemplo la agarosa-aldehído (glioxil), a pH 10 podrá interaccionar tanto el amino terminal de la lipasa como el resto de los grupos amino de las lisinas de la superficie enzimática (Mateo et al., 2010).

Si dejamos que interaccionen durante bastante tiempo, siguiendo el curso de inmovilización, irán aumentando el número de uniones enzima-soporte, cuando la enzima está inmovilizada suficientemente sin haber perdido demasiada actividad se procede a adicionar un compuesto que reduce los enlaces, borohidruro de sodio (NaBH_4), y los hace irreversibles al mismo tiempo que se bloquean los grupos reactivos del soporte que no hubiesen interaccionado con la enzima (Mateo et al., 2010).

Además de estos grupos reactivos (grupos epóxido o grupos glioxil) los soportes tienen grupos con carga positiva, con carga negativa, con grupos quelato, etc., De este modo a pH 7 la enzima se adsorbe sobre el soporte con distintas orientaciones y después se incuba a pH 10 para que las Lys presentes en cada superficie adsorbida puedan reaccionar covalentemente sobre el soporte, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** (Mateo et al., 2010).

1.6. TÉCNICAS DE ESTABILIZACIÓN ADICIONAL DE ENZIMAS YA INMOVILIZADAS Y ESTABILIZADAS

La modificación post-inmovilización es muy sencilla (química en fase sólida) y podemos hacer modificaciones controladas con polímeros polifuncionales, polietilenglicol, < dextrano, etc. Las enzimas inmovilizadas no pueden agregar y no se pueden producir entrecruzamientos intermoleculares con reactivos bifuncionales ya que las moléculas de enzima están aisladas y completamente dispersas sobre la superficie del soporte. También la reacción se detiene muy fácilmente por filtración del derivado modificado y se eliminan los reactivos que no han reaccionado, incluso polímeros con tamaño similar a la proteína inmovilizada se pueden separar muy fácilmente. Algunas de las técnicas más interesantes son:

1) Recubrimiento de los derivados con polímeros hidrofílicos

Generan un ambiente hidrofílico estabilizante e incluso sirve para estabilizar la estructura cuaternaria de enzimas multiméricas.

Enzima adsorvida sobre soportes hidrofóbicos y recubierta con polietilenimina

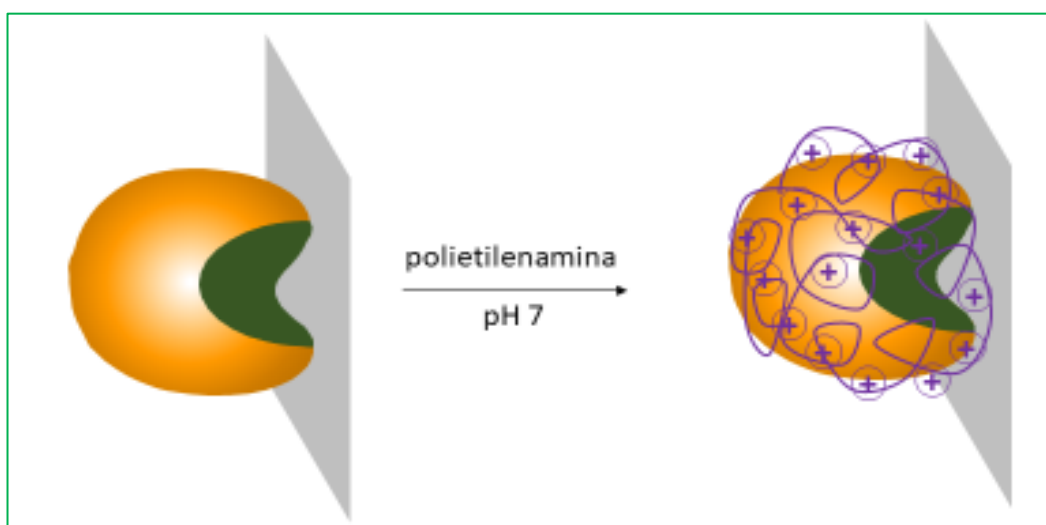


Figura 1.7 - Estabilización de lipasas inmovilizadas sobre soportes hidrofóbicos por recubrimientos posterior con polímeros hidrofílicos (pe., polietilenimina).

2) PEGilación de la superficie de la enzima inmovilizada

- a) Modificación directa de Lys con derivados de PEG
- b) Modificación suave de Lys con dextrano oxidado y modificación del dextrano oxidado con amino +-PEG (Fang et al., 2018; Draper et al., 2017; Zhao et al., 2017; Zhao et al., 2017; Reichert et al., 2016; Moreno-Pérez et al., 2016; Kurinomaru et al., 2015).
- c) Entrecruzamiento intermolecular con glutaraldehído o con formaldehído.

Las técnicas de estabilización por inmovilización y post-inmovilización son complementarias de cualquier otra mejora que se pudiera haber conseguido en las enzimas solubles por métodos bioquímicos y biológicos ya que las enzimas casi siempre se tienen que inmovilizar (pe., para los interesantísimos reactores de flujo continuo) y por ello siempre será interesante mejorar adicionalmente su estabilidad por técnicas de inmovilización y post-inmovilización.

1.7. RELEVANCIA DE LAS LIPASAS COMO CATALIZADORES INDUSTRIALES

Las lipasas (EC 3.1.1.3, Triacilglicerol éster hidrolasas) pertenecen a grupo de enzimas hidrolíticas con un gran interés en química orgánica ya que presentan una amplia especificidad por sustratos muy diferentes, lo cual contrasta, en algunos casos, con una elevada regio y enantioselectividad (Kurinomaru et al., 2015; Sharma et al., 2001; Shiraki, 2015; Hudson et al., 2001; Dyal et al., 2003; Nouredini et al., 2005; Bastida et al., 1998).

Su principal función biológica es catalizar el hidrolisis de triglicéridos para obtener como producto final ácidos grasos libres y glicerol o productos intermedios como mono o diglicéridos. Las lipasas han sido encontradas en muchas especies de animales, plantas y microorganismos (Xavier Malcata et al., 1990).

Sin embargo, las lipasas microbianas son mucho más versátiles y presentan características interesantes como estabilidad en solventes orgánicos, actividad bajo diversas condiciones, alta especificidad de sustrato, así como regio y enantio selectividad.

Son ampliamente estudiadas con el objetivo de ser útiles en diferentes procesos biotecnológicos, algunas poseen características, como la especificidad por el ácido graso (acil especificidad) especificidad posicional (regio-selectividad) y estéreo-especificidad, lo que hace atractivas a estas enzimas para diferentes aplicaciones en la industria biotecnológica.

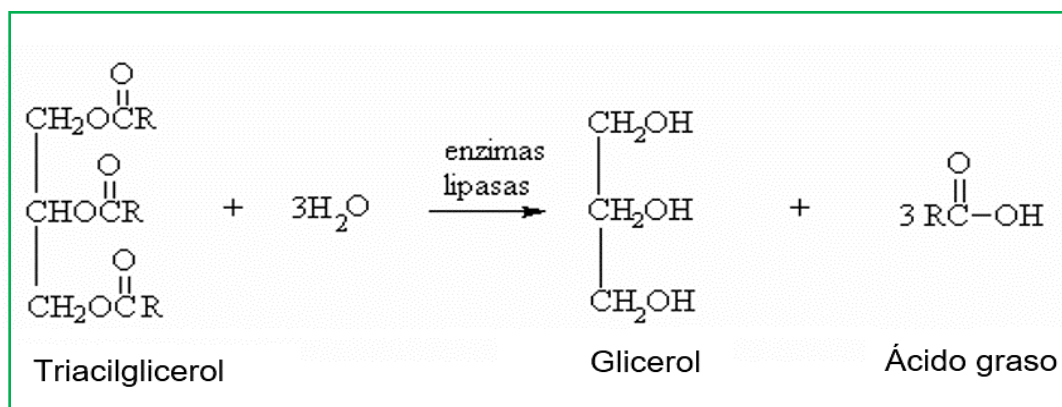


Figura 1.8 - Reacción natural de las lipasas. Hidrolisis de triglicéridos para producir ácidos grasos y glicerol.

Entre las aplicaciones más exitosas de las enzimas están aquellas que se consiguen con sus formas inmovilizadas. Esto se debe a las ventajas que confiere la inmovilización, entre las que se encuentran: la posibilidad de recuperar la enzima del medio de reacción, la obtención de un producto no contaminado con la enzima, y el incremento de la estabilidad operacional del biocatalizador.

Las lipasas han suscitado un interés creciente para la industria debido a su versatilidad, estereoselectividad, estabilidad frente a solventes orgánicos y capacidad de sintetizar compuestos orgánicos en mezclas de reacción con baja actividad de agua (Persson et al., 1999; Vicente et al., 1998; Xavier Malcata et al., 1998; Serra, 2005; Stergiou et al., 2013).

- Procesos, modificaciones de aceites (omega-3, biodiesel, etc.)
- Hidrolisis, síntesis de intermedios farmacéuticos (asimétricas, enantioselectivas)
- Medios de reacción agua, solventes anhidros, solvente-free, etc.
- Reactores de flujo continuo los más sostenibles.

1.8. CARACTERÍSTICAS PARTICULARES DE LA ESTRUCTURA DE LAS LIPASAS ÚTILES PARA SU INGENIERÍA

Los sustratos naturales de las lipasas son los aceites y grasas. Estos no son solubles en agua y forman emulsiones con grandes gotas de aceite. Por ello, el mecanismo de acción de lipasas es bastante complejo. En ausencia de interfases hidrofóbicas las lipasas tienen una estructura cerrada donde el centro activo es inaccesible a los sustratos. En contacto con la superficie hidrofóbica de los aceites, las lipasas exhiben una estructura abierta hidrofóbica que se adsorbe

sobre las gotas de sustrato. Este proceso de transición entre la lipasa cerrada y la lipasa abierta en contacto con superficies hidrofóbicas se denomina “activación interfacial”. La estructura abierta de la lipasa tiene en el centro activo formado por una superficie hidrofóbica de gran tamaño y ello provoca que sea muy estable adsorbida a superficies hidrofóbicas y sea muy inestable en ausencia de interfases y se pueda plegar a la estructura cerrada que no tiene grandes regiones hidrofóbicas expuestas al medio.

En medios acuosos y ausencia de interfases la estructura de las lipasas es compleja como se muestra en la figura uno: mayoritariamente posee la estructura cerrada, pero en un ligero equilibrio con una forma abierta inestable. De hecho, las lipasas solubles exhiben actividad esterasa (incluso con p-nitrofenil palmitato). La forma abierta e inestable se puede estabilizar formando agregados bimoleculares donde las dos estructuras abiertas interactúan entre sí a través de sus centros activos hidrofóbicos. Este fenómeno estructural complejo puede ayudarnos a desarrollar técnicas de inmovilización específicas de las lipasas.

i. inmovilización de la estructura abierta de la lipasa por adsorción interfacial de la lipasa abierta sobre soportes hidrofóbicos

Igual que las lipasas se adsorben sobre gotas de aceite, también se pueden adsorber sobre cualquier soporte hidrofóbico (Verger, 1997; Bastida et al., 1997; Fernandez-Lafuente et al., 1998; Palomo et al., 2002; Fernandez-Lorente et al., 2008; Palomo et al., 2008; Xie & Huang, 2018; Guisan et al., 2020). De este modo la estructura abierta de las lipasas se puede adsorber y estabilizar sobre la superficie de cualquier soporte hidrofóbico. Algunos soportes que se pueden utilizar son:

- a) Derivados de geles de agarosa (butil, fenil y octil agarosa)
- b) Soportes de metacrilato (con grupos octil, octadecil, etc.)
- c) Placas hidrofóbicas para la posterior inmovilización de otras enzimas

ii. Inmovilización de la estructura abierta de las lipasas mediante captura de agregados bi-moleculares de la lipasa abierta

Si los derivados bimoleculares de las lipasas tuviesen los dos aminos terminales relativamente próximos estos se podrían unir por unión covalente bi-puntual sobre soportes glioxil altamente activados. Esta inmovilización sería muy selectiva de estos agregados y nos servirían para “capturarlos” y estudiar sus propiedades. La lipasa monomérica (abierta o cerrada) no se pueden inmovilizar ya que la unión unipuntual amino-aldehído es imposible. La reacción entre un único grupo amino de la enzima y un único grupo aldehído en el soporte glioxil produce una base de Schiff muy inestable.

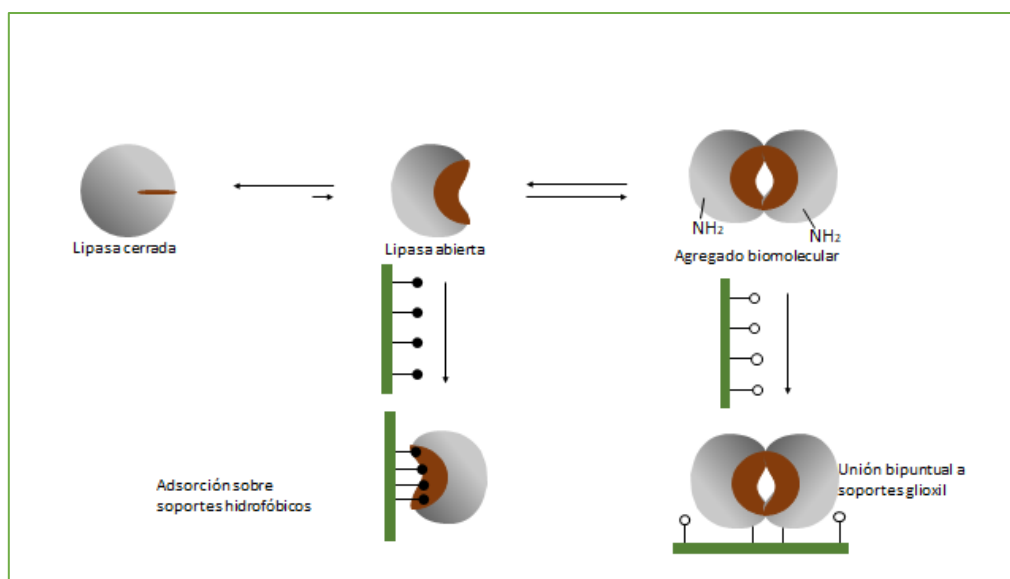


Figura 1.9 - Posible estructura de las lipasas en disolución por enzima de 1 mg/mL. Se encuentran mayoritariamente como agregados bimoleculares que se pueden inmovilizar (unión covalente, adsorción iónica, etc.). Las moléculas aisladas abiertas se pueden adsorber.

iii. Inmovilización de la forma nativa e las lipasas (cerrada o abierta con detergentes)

Como se observa en la figura la adición de un surfactante (detergente) en una disolución de lipasas promueve la estabilización de la estructura abierta (el detergente estabiliza la forma abierta hidrofóbica de la lipasa. La adicción del detergente también prueba la disociación del agregado biomolecular. Por eso, en presencia de detergente, la forma mayoritaria de las lipasas es su forma abierta estabilizada por el detergente. La unión unipuntual de esta forma nos permitirá obtener derivados de la lipasa nativa: en presencia de detergente tendremos la forma abierta inmovilizada por un único enlace. Si eliminamos el detergente recuperaremos la lipasa cerrada sin posibilidad de formar agregados bimoleculares. La unión unipuntual de la enzima nativa se puede realizar por

unión covalente a soportes glioxil en presencia de agentes estabilizantes de las bases de Schiff: pe., ditioneitol (DTT), acetil-cisteína, etc.

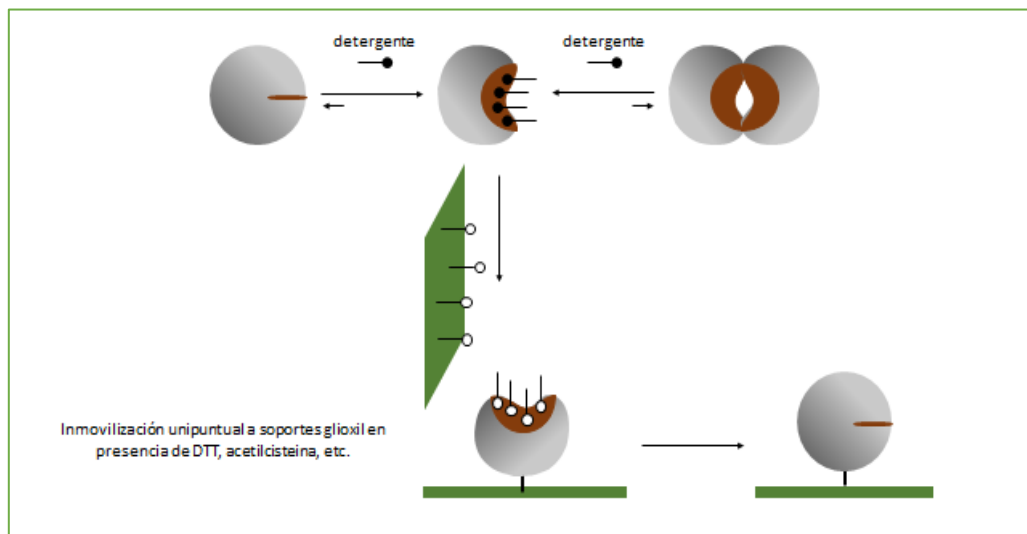


Figura 1.10 - Posible estructura de las lipasas solubles en presencia de disolvente. Presentan mayoritariamente la forma aislada de la lipasa hiperactivada por el surfactante (TRITON, CTAB, etc.). Se puede inmovilizar covalentemente a través del amino terminal.

De este modo podremos analizar y comparar las propiedades funcionales (actividad, estabilidad y selectividad) de la lipasa cerrada, de la lipasa abierta por detergentes o por soportes hidrofóbicos y del agregado bimolecular de la lipasa (Guisan et al., 2020; Guisan et al. 2020; López-Gallego et al., 2020).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es estudiar la relación entre las diferentes estrategias de inmovilización de lipasas y las propiedades de los diferentes derivados obtenidos: actividad, estabilidad, selectividad. Este objetivo principal se divide en cuatro sub-objetivos:

1. La inmovilización de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) con diferentes orientaciones sobre la superficie del soporte:
 - a. Adsorción de la forma abierta a través de su centro activo sobre la superficie de soportes hidrofóbicos.
 - b. La inmovilización covalente a través de grupos amino superficiales.
 - c. La adsorción iónica a través de grupos carboxilo superficiales sobre diferentes intercambiadores aniónicos.
2. Evaluación de los diferentes derivados inmovilizados de TLL: actividad, estabilidad térmica a diferentes pHs, actividad y selectividad para la hidrólisis de aceite de sardina, rico en ácidos grasos omega-3 (eicosapentaenoico (EPA) y docohexaenoico (DHA)).
3. La inmovilización de agregados bi-moleculares de TLL por inmovilización simultánea de los dos aminos terminales de las dos moléculas agregadas sobre soportes glioxil-agarosa a pH 8,5. A este pH la enzima solo se puede inmovilizar por unión simultánea de dos aminos terminales a dos grupos glioxil del soporte. De este modo fijamos e inmovilizamos el agregado bi-molecular de una lipasa.
4. La captura e inmovilización de agregados bimoleculares de otras lipasas: Lipasas de *Cándida antarctica* fracción B (CALB), lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML) y una fosfolipasa comercial (la *Lecitasa* de Novozymes). Estudio de su estabilidad térmica.

3.MATERIALES

PROVEEDOR	PRODUCTO
Enzimas	
Novo Nordisk (Dinamarca)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Thermomyces lanuginose</i> (TLL) - <i>Rhizomucor miehei</i> (RML) - <i>Candida antarctica B</i> (CALB) - <i>Lecitasa</i> (LC)
Soportes	
GE Healthcare (Uppsala, Suecia) Agarose Bead Technologies (Madrid, España)	<ul style="list-style-type: none"> - Octyl Sepharose CL-4B - BrCN Sepharose - Agarosa 10BCL - Agarosa 6BCL
	<ul style="list-style-type: none"> - Soportes agarosa activados con grupos aldehídos (Glioxil agarosa) - fueron sintetizados según se describe en - Guisan, 1988
Sustratos	
Sigma Chemical CO.St. Louis,(EE.UU.)	<ul style="list-style-type: none"> - P-nitrofenil butirato (p-NPB) - Aceite de oliva - Aceite alto oleico
BiotecBTSA	<ul style="list-style-type: none"> - Aceite de sardina
Productos Químicos	
Sigma Chemical CO. St. Louis, EEUU) Sharlab (Barcelona, Spain)	<ul style="list-style-type: none"> - Bromuro de hexadeciltrimetilamónio (CTAB) - Tris base - Triton® X-100 (TX) - Polietilenimina(PEI)diferentestamaños comerciales - Polialiamina (PAA) PM 17.500 - 1-etil-3(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) - Ciclohexano - Borohidruro de sodio (NaBH₄) - Etilendiamina (EDA) - Patrones de ácidos EPA y DHA - Patrones de ácidos Linoleico y Oleico - Acetonitrilo - Etanol
Equipamiento	
RP-HPLC	<ul style="list-style-type: none"> - Columna de fase inversa (Ultrabase- C18,150 x 4.0mm) - Inyector Spectra Physic SP 100 - Detector de UV Spectra Physic SP 8450
Balanza	- Sartorius Basic
Sonificador	- Selecta
Centrifugas	- Beckman Allegra X-12 Centrifuge
pHmetro	- Hamilton, Slimtrode. Electrodo de pH
Baños termostáticos	- Grant JV Nova
Rodillos agitadores	- Stuart Roller mixer
Campana flujo laminar	- Romero
Espectrofotómetro	- Jasco V-730

4.MÉTODOS

4.1. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

4.1.1. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración proteica de las disoluciones enzimáticas preparadas en la presente Tesis doctoral, fue determinada utilizando el método de Bradford (Bradford,1976). Se preparó una curva de calibración a partir de soluciones a diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA). Para realizar las mediciones se tomó un volumen de 0.8mL del buffer y se añadieron 0.2 mL del reactivo Bio-Rad para completar un volumen total de 1mL. Se mezcló bien y se dejó reaccionar por 10 minutos para posteriormente leer la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 595 nm (Moreno-Perez et al., 2013).

4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LIPASA INMOVILIZADA SOLUBLE

4.2.1.Cuantitativa. Hidrolisis de p-nitrofenol butirato (pNPB)

Para seguir el proceso de inmovilización, las actividades de las lipasas solubles y sus preparaciones inmovilizadas se analizaron en un espectrofotómetro con un elemento termostático y con agitación magnética continua midiendo el incremento de absorbancia a 348 nm ($\epsilon = 5,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) producido por la liberación de p-nitrofenol (PNP) por hidrólisis de 0.4 mM p-nitrofenil butirato (pNPB) en 25 mM de tampón de fosfato sódico a pH7 y 25°C.

Para iniciar la reacción, diferentes cantidades de solución de lipasa (blanco, sobrenadante o suspensión) se añadió a 2.5mL de solución de sustrato. La actividad enzimática se calculó como μmoles de pNPB hidrolizado por minuto por mg de enzima (IU) en las condiciones descritas anteriormente (Mateo et al., 2006).

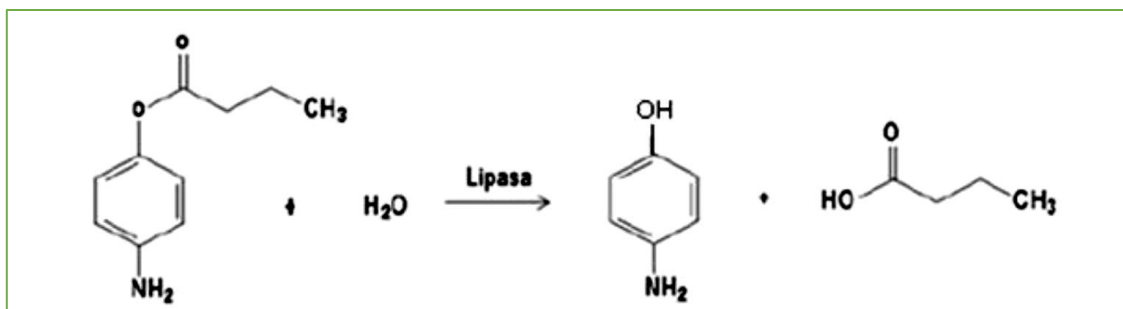


Figura 4.1 - Hidrólisis del p-NPB a PNP por actuación de una lipasa.

4.3. PREPARACIÓN DE SOPORTES

Las características de los soportes son de gran importancia en la determinación de la eficiencia del sistema de inmovilización de enzimas. Las propiedades ideales de un soporte incluyen la resistencia física a la compresión, hidrofobicidad, inertes entre las enzimas y sus derivados y bajo costo. Estas características son de gran importancia para la selección del método de inmovilización bajo determinadas condiciones técnicas. (Moreno-Perez et al., 2017).

El soporte octyl- agarosa se ha preparado según el protocolo: lavado y filtrado al menos 10 volúmenes de agua destilada para eliminar el etanol que le añade el fabricante para su conservación.

La agarosa presenta características variadas para su uso: estructura macroporosa, fácil disolución acuosa, fácil activación y derivatización de los soportes. Además, presentan muy bajos impedimentos estéricos en la reacción de los grupos amino de la proteína con los glioxil del soporte. Presenta poros de diferentes tamaños pudiendo variar el tamaño de estos poros con la concentración de agarosa empleada. Los grupos glioxil son grupos muy estables (en un amplio rango de condiciones) que reaccionan con aminas primarias, por lo que, en principio podrían ser útiles para procesos de inmovilización (Mateo et al., 2007b; Guisan et al., 2001).

4.3.1. Preparación de agarosa bromocianógeno (Ag-BrCN)

El soporte de agarosa activado con BrCN se preparó de acuerdo con las instrucciones del protocolo general. El soporte comercial fue previamente suspendido en agua, a pH 2,0-3,0 para su hidratación y conservación de los grupos reactivos. La inmovilización de la enzima al soporte se realiza a pH neutro, baja temperatura y en condiciones suaves para evitar la interacción entre

la enzima con el soporte y la formación mayoritariamente de unión del tipo unipuntual. Una vez que la enzima estaba inmovilizada, se incubó en etanolamina 1M a pH8 por 2h para bloquear cualquier grupo reactivo remaneciente. Finalmente, se lavó la preparación inmovilizada con agua destilada (Dias et al., 2012; Mateo et al., 2013).

a) Preparación agarosa glioxil

La activación de agarosa con grupos glioxil se realizó por esterificación de agarosa 10BCL con glicidol. La oxidación a grupos aldehído se obtuvo mediante adición de una solución de peryodato de sodio (Mateo et al., 2006; Moreno-Pérez et al., 2015).

b) Preparación de agarosa polietilenimina (Ag- PEI) y Polialiamina (Ag-PAA)

Los soportes de agarosa 4 BCL se prepararon a partir de Ag-glioxil. La PEI (polietilenimina) de tamaño 25KDa se unió a dicho soporte. Para la preparación de la polialilamina (PAA) de tamaño 17.500KDa el procedimiento fue el mismo (Mateo et al., 2000a).

4.4. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

4.4.1. Generalidades

Las enzimas se inmovilizaron bajo agitación muy suave usando diferentes soportes de agarosa al pH y a temperatura indicados. Se retiraron muestras de blanco, sobrenadante y suspensión en diferentes momentos para determinar sus actividades catalíticas durante el proceso, usando ensayos enzimáticos descritos anteriormente.

El rendimiento se define con la cantidad de enzima unida al soporte, calculada como la relación entre la actividad en el sobrenadante en comparación con la actividad en el blanco. La actividad expresada es la final del biocatalizador, se calcula la relación de la actividad en la suspensión final después del proceso de inmovilización y la actividad del blanco.

$$\text{Rendimiento de inmovilización (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Actividad final sobrenad (U/mL)}}{\text{Actividad inicial (U/mL)}}\right) \cdot 100$$

La actividad expresada se define como la actividad recuperada sobre el soporte sólido después del proceso de inmovilización. En momentos diferentes, se retiraron muestras de sobrenadante,

suspensión y la solución de enzima de referencia (blanco) y se ensayó la actividad enzimática para el cálculo de ambos parámetros.

$$\text{Actividad expresada (\%)} = \left(\frac{\text{Actividad suspensión (U/mL)}}{\text{Actividad inicial (U/mL)}} \right) \cdot 100$$

La actividad recuperada de la enzima inmovilizada, se define como la diferencia entre la pendiente (absorbancia medida a 348nm con el tiempo) de la suspensión de referencia (blanco) y la absorbancia de la suspensión (soporte) y sobrenadante en las condiciones establecidas. En este caso, la fórmula empleada es:

$$\text{Actividad Recuperada (\%)} = \left(\frac{\text{Suspensión}}{\text{Blanco}} - \frac{\text{Sobrenadante}}{\text{Blanco}} \right) \cdot 100$$

4.5. INMOVILIZACIÓN HIDROFÓBICA. SOBRE OCTIL- AGAROSA

Las lipasas fueron inmovilizadas sobre el soporte por activación interfacial a una fuerza iónica de (25mM) en tampón de fosfato de sódico a 25°C y a pH7. Periódicamente, la actividad de la suspensión y el sobrenadante se analizaron mediante pNPB, como se describió anteriormente. Finalmente el derivado se filtró y se lavó con agua destilada y fosfato de sodio 10mM a pH7 (Mateo et al., 2013).

La carga enzimática de las preparaciones inmovilizadas fue aproximadamente 1mg/g de soporte, con rendimientos de inmovilización superiores a 90 %, en comparación con la actividad inicial (Fernandez–Lafuente et al., 1998; Abreu Silveira et al., 2019).

4.6. INMOVILIZACIÓN COVALENTE

4.6.1. Inmovilización en soportes agarosa activados con grupos bromuro de Cianógeno (Ag-CNBr)

La inmovilización se llevó a cabo en condiciones suaves para que la enzima conservara sus propiedades similares a la enzima soluble. Se resuspendió 1 g de soporte Ag-CNBr en 10ml de una solución enzimática en tampón fosfato de sodio 25mM a pH 7.0. Esta suspensión se incubó durante 15 min a 4°C bajo una agitación muy suave. Finalmente, el biocatalizador se filtró a vacío, se lavó con agua destilada y se incubó con 10 mL de etanolamina 1M a pH 8.0 durante 2 horas con agitación muy suave para bloquear los grupos activos remanentes. Finalmente, se filtró al vacío y se lavó con tampón fosfato de sodio 25mM a pH 7 y se almacenó a 4°C hasta su uso (Moreno-Perez et al., 2017; Mateo et al., 2007b).

4.6.2. Inmovilización Multipuntual sobre soportes agarosa activados con grupos glioxil

El soporte se preparó tal como está descrito (Guisan, 2006) introduciéndose en el soporte glioxil en sus superficie que pudieran dar lugar a la formación de enlaces con los grupos amino de la enzima. El derivado se preparó incubando 3g de soporte agarosa glioxil en una suspensión enzimática de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 8,5 o 10 y a 25°C bajo agitación suave, durante un tiempo variable hasta la inmovilización de la lipasa. El último paso de inmovilización fue reducir las bases de Schiff con diferentes concentraciones de borohidruro sódico (1mg/mL) en una suspensión 1:10(v/v) soporte por volumen total (en algunos casos fue necesario añadir bicarbonato de sodio 100mM a pH10, inmediatamente antes de reducir para cumplir esta relación) durante 30min a 25°C. En algunos casos se incubó con detergente CTAB o Tritón X -100. Finalmente, el derivado se filtró y se lavó con agua destilada y tampón de fosfato de sodio 25mM pH7.0 (Moreno-Perez et al., 2017; Guisan, 1988).

4.6.3. Inmovilización sobre soportes de adsorción física mediante intercambio iónico: Ag-polialilamina, Ag-polietilenimina, DEAE Sepharose, Q-Sepharose

Se incubó 1 g de soporte con 10mL de una solución enzimática en fosfato de sodio 25mM pH 7.0. La suspensión se agitó a 25°C durante el tiempo necesario. Finalmente, la preparación se lavó y

se filtró con tampón 25mM pH 7.0. En algunos casos se incubó con detergente CTAB (Moreno-Perez et al., 2017).

4.7. TÉCNICAS POST-INMOVILIZACIÓN

4.7.1. Modificación física con polietilenimina (PEI)

Se mezcló 1 gramo del biocatalizador no modificado con 16mL de fosfato de sodio 5mM que contenía 25mg/mL de PEI de 25 KDa a pH 7.0. Esta mezcla se incubó durante 16 horas a 4°C, bajo agitación muy suave. Finalmente, el biocatalizador se filtró a vacío y se lavó con 5 volúmenes de tampón fosfato de sodio 5mm, pH7.0 (Trobo-Maseda et al., 2018; Virgen-Ortíz et al., 2017).

4.7.2. Modificación física con polialilamina (PAA)

Pesar la PAA necesaria para que quede al 2% en tampón bicarbonato 100mM pH10 de forma que tengamos 0,2g de PAA/mL de soporte. 50 g de agarosa activada es igual 71mL agarosa, 14,2 g de PAA y 710 ml de tampón bicarbonato sódico 100mM pH 10. Tras adición, dejar reaccionar 3 horas a 25°C, bajo agitación muy suave. A continuación, se reduce con borohidruro a pH10, 10mg/mL, durante 2 horas a 25°C. Después se lavó con tampón acetato 100mM pH 4, después con tampón borato 100mM pH9. Finalmente se lavó con agua destilada (Virgen-Ortíz et al., 2017).

4.8. DESORCIÓN DE LIPASAS DE SOPORTES HIDROFÓBICOS

Se resuspendieron 0,5 g de cada biocatalizador en 5mL de un tampón fosfato sódico 50mM pH7. Después de la primera medida se añadió 125ul de sulfato de amonio 1M. Se recogieron muestras a cada 15 min al mismo tiempo se añadió sulfato de amonio. La desorción se llevó acabo a 25°C. Después de 30 minutos más de 90% de la actividad inicial se desorbe (Fernandez-Lafuente et al., 1998; Fernandez-Lorente et al., 2008).

4.9. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE PREPARACIONES ENZIMÁTICAS

4.9.1. Inactivaciones térmicas de diferentes preparaciones

Se resuspendieron 0,5 g de cada biocatalizador en 5mL de tampón con el indicado para cada caso, las preparaciones fueron incubadas en un baño termostático a diferentes temperaturas bajo las condiciones de pH, fuerza iónica y concentración especificadas para cada estudio. En todos

los casos, de recogieron muestras de la suspensión a diferentes tiempos y la actividad se ensayó como se describió en apartado 4.1. La actividad residual se calculó como la relación entre la actividad en un momento dado y la actividad al comienzo de la incubación (Moreno-Perez et al., 2013).

4.10. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ACEITE CATALIZADA POR LIPASAS INMOVILIZADAS

La hidrólisis se llevó a cabo bajo las condiciones estándar (Fernández-Lorente; Pizarro et al., 2011) se colocaron en un reactor 5 mL de ciclohexano, 5 ml de tampón Tris-OH 100 M pH7 u tampón acetato 100mM pH5 y 0.5 mL. de diferentes aceites conforme se tratase sardina, alto oleico u oliva, bajo una agitación de 150rpm y a una temperatura de 25°C o 4°C conforme o ensayo durante 30 minutos para mezclar bien los sustratos en el medio de reacción. Después comenzó la reacción añadiendo diferentes cantidades de los derivados de las lipasas y se mantuvo mediante agitación magnética bajo las condiciones anteriores en el tiempo. La concentración de ácidos fue determinada a diferentes tiempos mediante HPLC (Moreno-Pérez, et al., 2015).

4.11. ANÁLISIS POR HPLC

Para todos los casos a diferentes tiempos alícuotas de 0.1mL de la fase orgánica fueron disueltas en 0.8mL de acetonitrilo. La fase orgánica se separa fácilmente de la acuosa cuando se detiene la agitación magnética. Los ácidos producidos fueron analizados por RP-HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector de UV Spectra Physic SP 8450) usando una columna de fase reversa (Kromasil C18 150 x 4.0mm). Los productos se eluyeron a una velocidad de flujo de 1mL/min con acetonitrilo/Tris-OH100mM (75:25, en volumen), pH3 (Fernández-Lorente; Pizarro et al., 2011).

La detección UV se realizó a 215 nm. Los tiempos de retención de los AG fueron de 7,809. min para EPA y 9.829 min para DHA, 12,09 min para linoleico y 17,89 min para oleico. Los tiempos y concentraciones de los productos obtenidos fueron comparados con los patrones comerciales (Fernández-Lorente et al., 2011; Valenzuela et al., 2006).

4.11.1. Cálculo de la selectividad EPA/DHA y Linoleico/Oleico

La actividad inicial se calculó como nmoles de PUFAs por minuto y mg de derivado con un 10% de conversión de producto. La selectividad se calculó como el cociente entre la concentración de

EPA generada respecto a la de DHA, cuando se ha formado alrededor de un 10% de ácidos grasos poliinsaturados totales (Guisan et al., 2001; Abreu Silveira et al., 2017; Carrera & Riva, 2000).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. PREPARACIÓN DE DERIVADOS INMOVILIZADOS DE LA LIPASAS DE *THERMOMYCES LANUGINOSUS* (TLL)

5.1.1. Estudio del estado de agregación de las lipasas solubles

Utilizando disoluciones 1 mg/mL de 4 lipasas solubles estudiamos su estado de agregación en presencia y ausencia de surfactantes. Los experimentos se hicieron en tampón fosfato 50 mM pH 7.0. En ausencia de surfactante, para a todas las lipasas (excepto CALB) se observaron dos picos bien definidos: uno pequeño de un 40% y uno bastante mayor (un 60 %). Cuando a la disolución enzimática le añadíamos un 0.1% de surfactante (CTAB para Lecitasa y TLL y TRITON X-100 para RML) se observaba que el pico pequeño se hacía mucho mayor (80%) y el pico mayor disminuía al 20%. Para CALB observábamos resultados similares cuando utilizábamos una concentración de enzima 10 veces mayor.

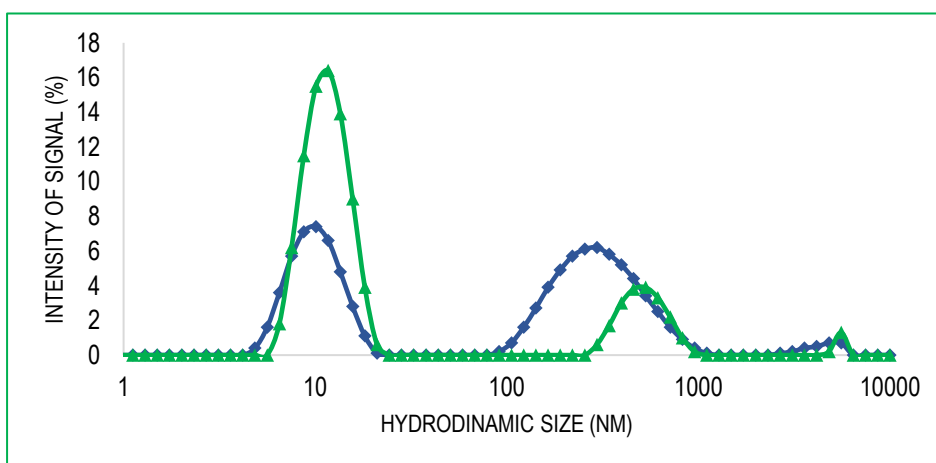


Figura 5.1 - Estudios por Dynamic Light Scattering de disoluciones de TLL (2 mg/mL) en presencia (línea verde) y ausencia (línea azul) del surfactante CTAB.

Los resultados obtenidos para Lecitasa y RML eran muy similares. Los valores de radio hidrodinámico no se corresponden cuantitativamente a los tamaños de los diferentes tipos de moléculas aisladas o agregados (son radios hidrodinámico que incluyen las diferentes capas de solvatación que rodean las moléculas de proteína). Pero el DLS sí que nos permite detectar muy fácilmente diferentes estados de agregación.

El hecho de que los agregados disminuyan muy significativamente en presencia de surfactantes parece indicar que la agregación se produce a través de interacciones hidrofóbicas y en las lipasas

las interacciones hidrofobicas mas probables serian las formadas por dos centros activos abiertos de dos moleculas de lipasas y en principio bajo esta hipotesis planteamos la inmovilización de lipasas en la presente Tesis Doctoral.

Asi, planteamos las distintas estructuras de las lipasas solubles en ausencia de detergente: lipasas aisladas con su forma cerrada, un pequeño porcentaje de lipasas aisladas con su forma abierta y dimeros de lipasas abiertas unidos por sus centros activos (Figura 5.2).

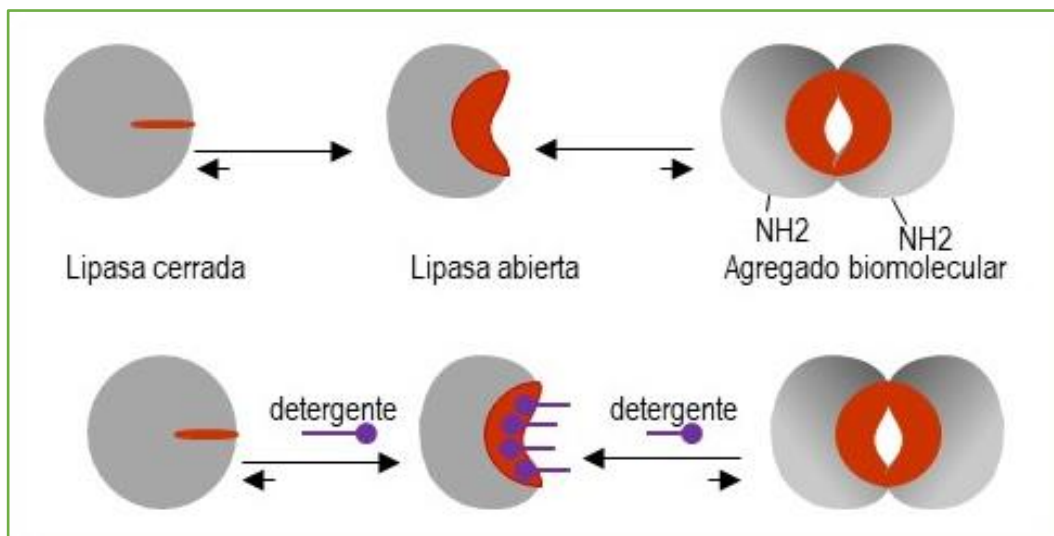


Figura 5.2 - Esquema de las estructuras de TLL en solución. En ausencia de detergente un porcentaje de la enzima es la molecula aislada y cerrada en un cierto equilibrio con la forma abierta de la molecula aislada y esta esta en equilibrio con el agregado biomolecular.

5.1.2. Inmovilización de TLL

A la vista de los resultados descritos nos planteamos la inmovilización de la TLL en presencia y ausencia de CTAB. De este modo, lograremos inmovilizar mayoritariamente la forma unimolecular de la lipasa (en presencia de CTAB) y también inmovilizar mayoritariamente el agregado biomolecular (en ausencia de CTAB).

Intentaremos las siguientes inmovilizaciones:

- Inmovilización de la forma abierta de la lipasa unimolecular por adsorción sobre soportes hidrofóbicos a pH 7.0 y temperatura ambiente. El centro activo abierto se estabiliza por adsorción a un soporte hidrofóbico.

- b. Unión covalente a agarosa activada con CNBr (CNBr-Sepharose) a pH 7.0 y 4 °C La enzima se inmovilizará a través del residuo amino terminal. En ausencia del CTAB los dos aminos terminales del agregado bimolecular se encuentran muy próximos y en mismo plano (Figura 5.3). Por ello, es posible que ambos aminos terminales reaccionen con el soporte simultáneamente y el agregado quede estabilizado.

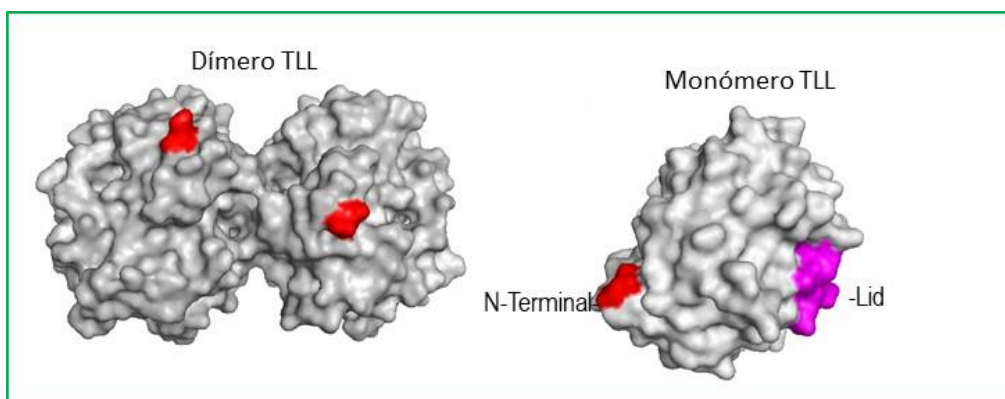


Figura 5.3 - Estructuras cristalográficas del agregado bimolecular de TLL y de la molécula de enzima aislada Rojo amino terminal, morado centro activo.

- c. Adsorción iónica sobre intercambiadores aniónicos

La TLL se inmovilizó sobre diferentes soportes (agarosa recubierta de PEI, agarosa recubierta de polialilamina, DEAE-Sepharose y Sepharose Q (agarosa activada con aminos cuaternarios) a pH 7.0 y temperatura ambiente. De nuevo esperamos que los agregados se adsorban sobre superficies próximas al centro activo y los agregados queden fijados sobre el soporte. En la enzima aislada es posible que la región más rica en carboxilos sea la opuesta al centro activo pero las regiones próximas al centro activo son también muy ricas en carboxilos y podemos pensar que en el agregado la región más rica en carboxilo es la región donde se unen los dos centros activos.

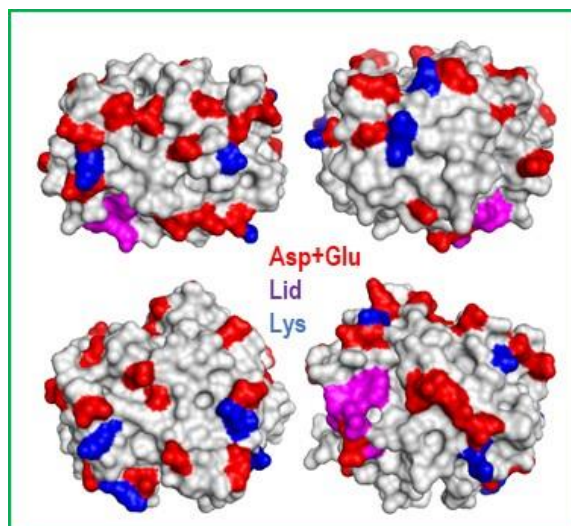


Figura 5.4 - Distribución de grupos carboxilo (en rojo) en la estructura aislada de TLL.

d. Seguimiento de la inmovilización

Como las condiciones de inmovilización son muy suaves (pH 7.0 y temperaturas entre 4 y 25 °C) la inmovilización se seguirá por la disminución de actividad del sobrenadante de la suspensión con el tiempo. En todos los casos se comprobará que efectivamente la enzima soluble (con o sin CTAB) no pierde más del 10% de su actividad durante el proceso de inmovilización (hasta 24 horas). De este modo, la caída de actividad del sobrenadante se puede asociar correctamente la enzima incorporada a los distintos soportes: la enzima que se ha inmovilizado.

e. Carga enzimática de los derivados

Ofrecemos una concentración moderadamente alta (0.5 mg/mL) para que en ausencia de CTAB la enzima se encuentre mayoritariamente asociada en agregados bimoleculares. Si la concentración fuera mayor, el porcentaje de agregados sería también mayor, pero tendríamos problemas difusionales (al ser derivados muy activos) y estos enmascararían los valores de actividad y estabilidad de los derivados obtenidos. En el caso del derivado octil ofrecemos una cantidad menor (0.1 mg/mL) para que la carga del derivado sea 1 mg de enzima/ mL de derivado. Ahora la agregación de la enzima soluble no es relevante.

5.1.3. Inmovilización de TLL sobre soportes hidrofóbicos

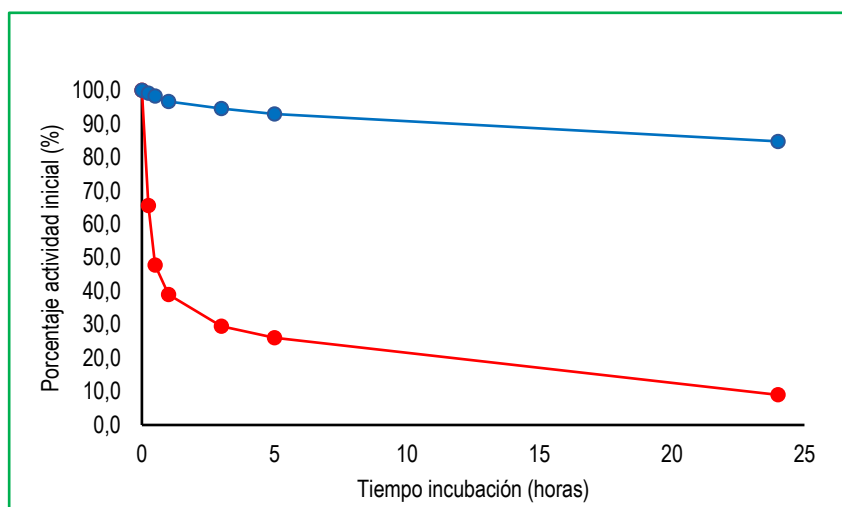


Figura 5.5 - Curso de inmovilización de TLL sobre octil-agarosa. Azul: blanco (enzima soluble sin soporte en las condiciones experimentales de la inmovilización). Rojo: actividad del sobrenadante de la mezcla de inmovilización.

La inmovilización es muy rápida y en 1 hora se inmoviliza el 50 % de la enzima ofrecida. El blanco con la enzima soluble (incubada a 25°C y pH 7.0) conserva el 90% de actividad después de 24 horas.

5.1.3.1. Recubrimiento de los derivados con polímeros

Después de la inmovilización por adsorción hidrofóbica los derivados se pueden recubrir con polímeros catiónicos (polietilenimina y polialilamina) ya que los laterales y la zona opuesta al centro activo (adsorbido y estabilizado sobre el soporte) son muy ricos en grupos carboxilos donde estos polímeros quedarán fuertemente adsorbidos (Figura 6). La modificación con polímeros de distinto tamaño apenas modificó la actividad de los derivados.

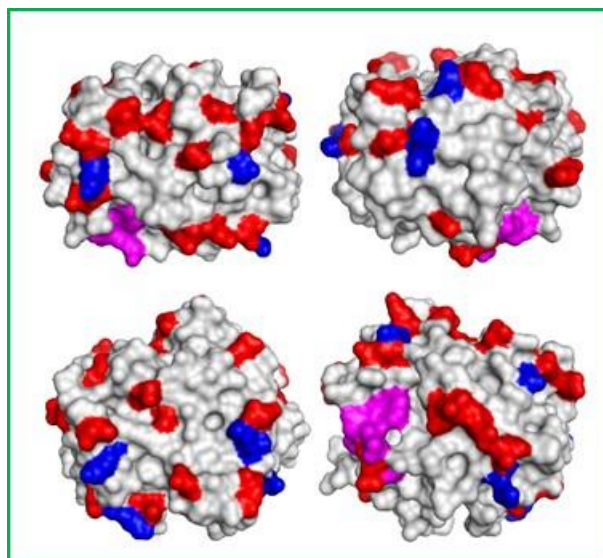


Figura 5.6 - Distribución de grupos carboxilo (en rojo) en la estructura aislada de TLL. Parece relativamente sencillo que los polímeros policationicos (PEI y PAA) se puedan adsorber muy fuertemente sobre la enzima inmovilizada sobre octil-agarosa.

5.1.4. Inmovilización covalente a soportes de agarosa activados con bromo-cianógeno

La inmovilización es muy rápida (quizás un poco más rápida para el agregado bimolecular). De nuevo el blanco (enzima soluble incubada en las condiciones de inmovilización) se mantiene muy activo. Quizás en presencia de detergentes, el blanco es un poco más inestable y cae al 85% al cabo de 24 horas.

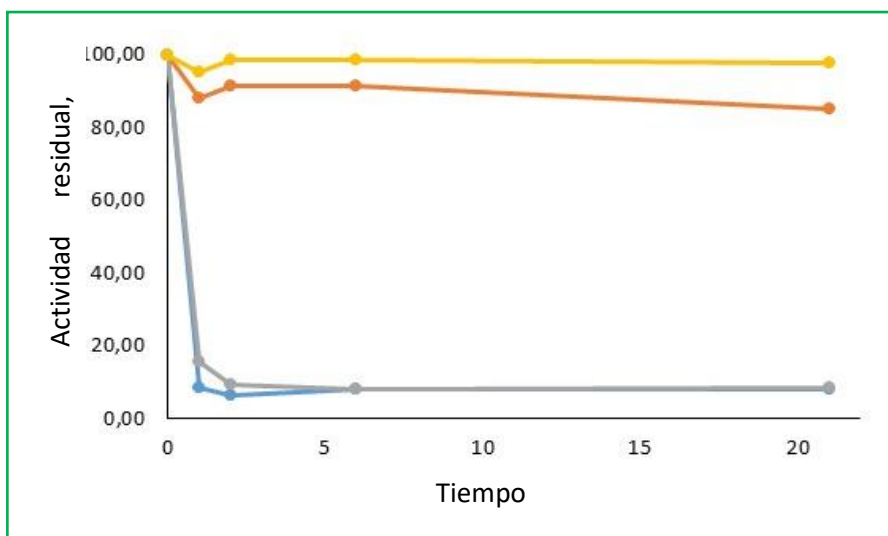


Figura 5.7 - Curso de la inmovilización covalente de TLL sobre agarosa activada con CNBr (CNBr activated Sepharose). Amarillo: enzima soluble incubada sin CTAB. Rojo: enzima soluble incubada con CTAB. Gris: sobrenadante de la mezcla de inmovilización con CTAB, Azul: sobrenadante de la mezcla de inmovilización sin CTAB.

5.1.5. Inmovilización TLL por adsorción sobre intercambiadores aniónicos

Las adsorciones se realizaron a pH 7.0 y 25 °C. En estas condiciones los blancos eran estable por 24 horas y su actividad disminuía hasta el 80 % en presencia del detergente.

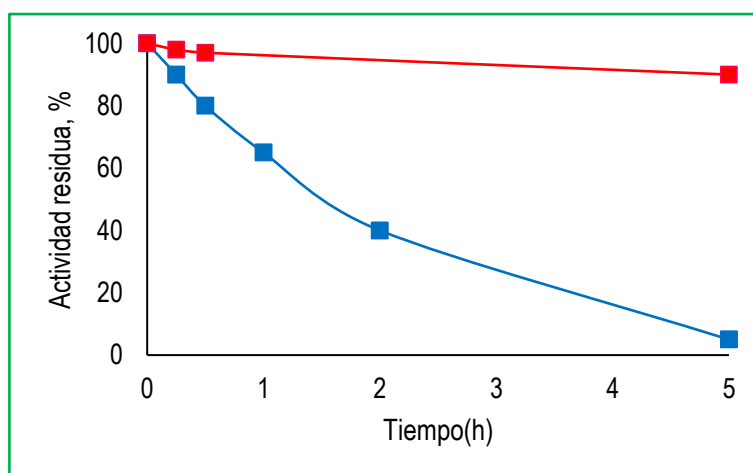


Figura 5.8 - Curso de inmovilización de TLL sobre agarosa modificada con PEI. Rojo: actividad de la enzima soluble sin CTAB. Azul: sobrenadante de la mezcla de inmovilización utilizando la enzima soluble en ausencia de CTAB.

La enzima se adsorbe bastante rápido sobre Agarosa recubierta con PEI de 25000 Da y un poco más rápido (60% en 5 horas) sobre agarosa recubierta con PEI de 60000 Da. En este último caso la inmovilización es más rápida en ausencia de CTAB (mayoritariamente el agregado bimolecular) que en presencia de CTAB (molécula de TLL aislada).

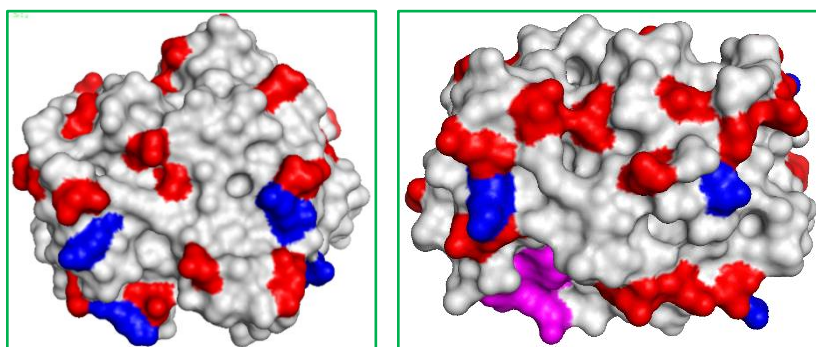


Figura 5.9 - Se observa que muchos residuos Asp y Glu (grupos carboxilo) se encuentran muy próximos al centro activo de la lipasa y por ello el agregado bimolecular se inmoviliza más rápido que la molécula de TLL Aislada.

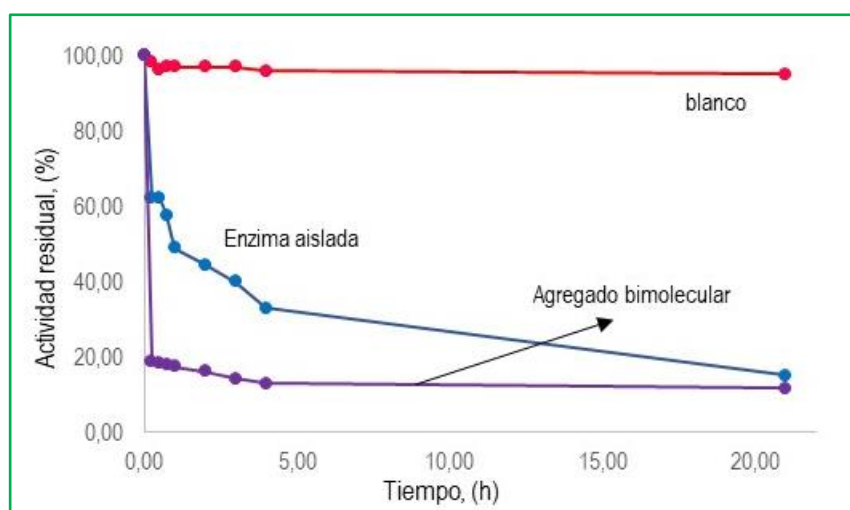


Figura 5.10 - La zona opuesta al centro activo tiene menos carboxilos que dos zonas laterales agregadas. Rojo. actividad de las enzimas solubles; Azul. Actividad del sobrenadante de la enzima inmovilizada en presencia de CTAB; Morado: actividad del sobrenadante de la enzima inmovilizada en ausencia de CTAB.

La adsorción de TLL sobre agarosa recubierta con PAA (polialamina) es más rápida que la adsorción sobre PEI y además las diferencias entre la adsorción de la molécula aisladas (inmovilización lenta) y la adsorción del agregado bimolecular son mayores. El 70 % del agregado bimolecular se adsorbe en menos de 1 hora y el 50 % de la enzima aislada se adsorbe en 3 horas. Hay que considerar que el agregado bimolecular no es el 100% ya que está mezclado con un 30%

de moléculas aisladas y en las moléculas aisladas (en presencia de CTAB) queda todavía un 20% de agregado sin disociar.

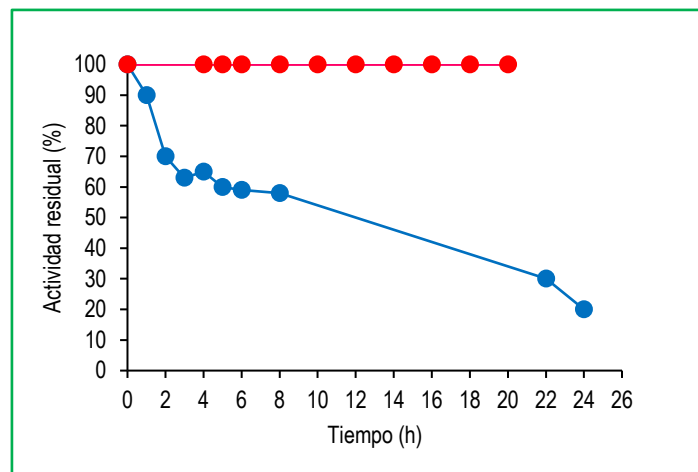


Figura 5.11 - Curso de adsorción de TLL sobre agarosa recubierta de polialilamina. Rojo: enzima soluble; Azul: sobrenadante de la enzima inmovilizada en presencia de CTAB.

Finalmente, también estudiamos la adsorción de TLL sobre agregados no poliméricos (DEAE-agarosa y agarosa-Q).

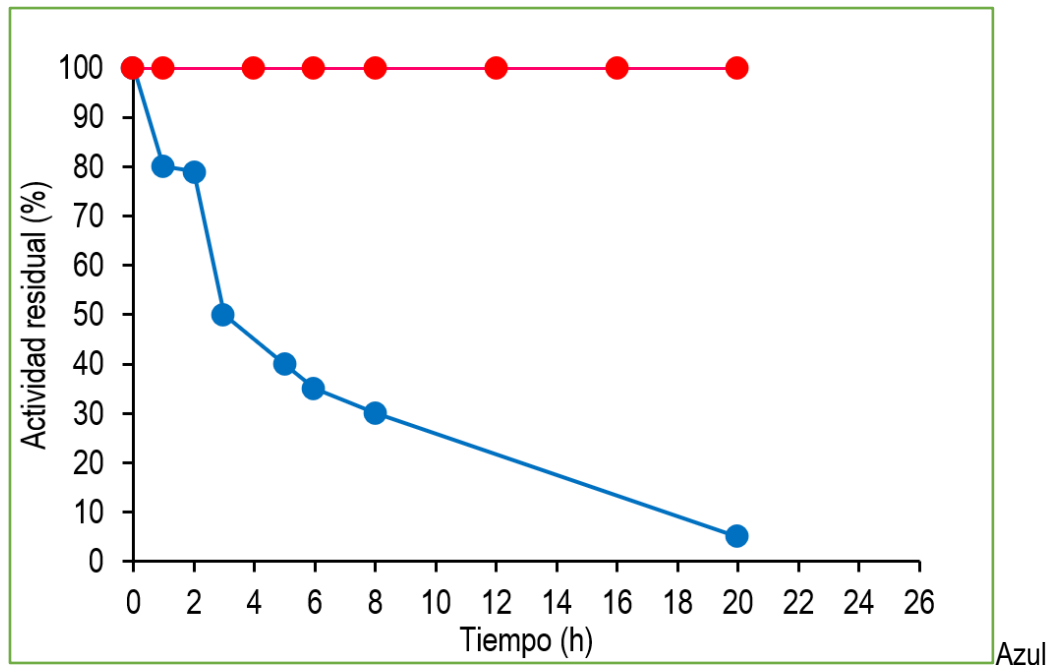


Figura 5.12 - Inmovilización de TLL en ausencia de CTAB sobre DEAE-Sepharose; Azul: actividad del sobrenadante de la enzima inmovilizada en ausencia de CTAB; Rojo: actividad de la enzima soluble.

También sobre estos soportes se observa una adsorción ligeramente más rápida del agregado bimolecular que la adsorción de la enzima aislada.

5.1.6. Conclusiones

Hemos sido capaces de preparar diferentes derivados de la disolución enzimática mayoritariamente unimolecular y de la disolución enzimática de agregados bimoleculares.

Los métodos de inmovilización fueron muy sencillos y desarrollados en condiciones experimentales muy suaves donde la lipasa soluble era muy estable. Los soportes activados eran muy estables y podían ser utilizados después de 1 mes de almacenamiento.

En general se inmovilizaban más rápidamente los agregados bimoleculares que la enzima unimolecular.

En el capítulo siguiente discutiremos las propiedades catalíticas de los diferentes derivados.

5.2. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS DERIVADOS INMOVILIZADOS DE TLL

Después de desarrollar diferentes técnicas sencillas de inmovilización de TLL tanto en su forma abierta como en su forma cerrada estudiamos las principales propiedades funcionales de los derivados. Entre ellas: actividad catalítica, Hiperactivación por surfactante, temperatura óptima, curso de inactivación térmica, hidrólisis de aceites, etc. A continuación, vamos a mostrar y discutir los resultados más relevantes.

DERIVADO	ACTIVIDAD, %
Enzima soluble inmovilizada	100
Octil	1000
CNBr-CTAB	80
CNBr	50
PEI-CTAB	20
PEI	50
DEAE-CTAB	75
DEAE	45
Octil- PAA	9500
Octil-PEI	9000

Tabla 5.1 - Actividad de los diferentes derivados inmovilizados. Se toma como 100% la actividad de la enzima soluble que se ha inmovilizado.

El derivado más activo era el que contenía la forma abierta de la TLL estabilizada sobre una superficie rígida. Este derivado era 10 veces más activo que la enzima soluble utilizada en el proceso de inmovilización. En este caso, el hueco que se forma entre la TLL abierta y el soporte es bastante grande y el derivado muestra la actividad correspondiente al proceso de Hiperactivación.

Por el contrario, los otros derivados de la forma abierta (preparados a concentración moderada de la enzima y en ausencia de CTAB) no mostraban hiperactivación e incluso mostraban menos actividad que la enzima soluble. Parece que la interacción entre las dos formas abiertas de agregado bimolecular se asocian muy intensamente y el hueco que queda entre ambas para que pueda penetrar el substrato es muy pequeño. La actividad del derivado covalente y los dos derivados obtenidos por adsorción iónica ronda el 50% de la enzima soluble que ha sido inmovilizada.

El derivado menos activo era el de la enzima soluble adsorbida sobre el soporte polimérico. Parece que el polímero puede interaccionar con toda la enzima cerrada y modificar el equilibrio entre la forma cerrada e inactiva y la forma abierta y activa.

La modificación adicional de los derivados octil con polímeros poli catiónicos (fuertemente adsorbidos sobre la superficie externa de la enzima) no altera prácticamente la hiperactivación que mostraba el derivado octil sin modificar. Ahora el centro activo abierto está protegido por el soporte y los polímeros no pueden interactuar con él.

5.2.1. Hiperactivación de derivados inmovilizados covalentemente por surfactantes (CTAB)

Los dos derivados inmovilizados sobre agarosa activada con CNBr (CNBr-Sepharose) se analizaron en presencia de distintas concentraciones de CTAB en la mezcla de reacción.

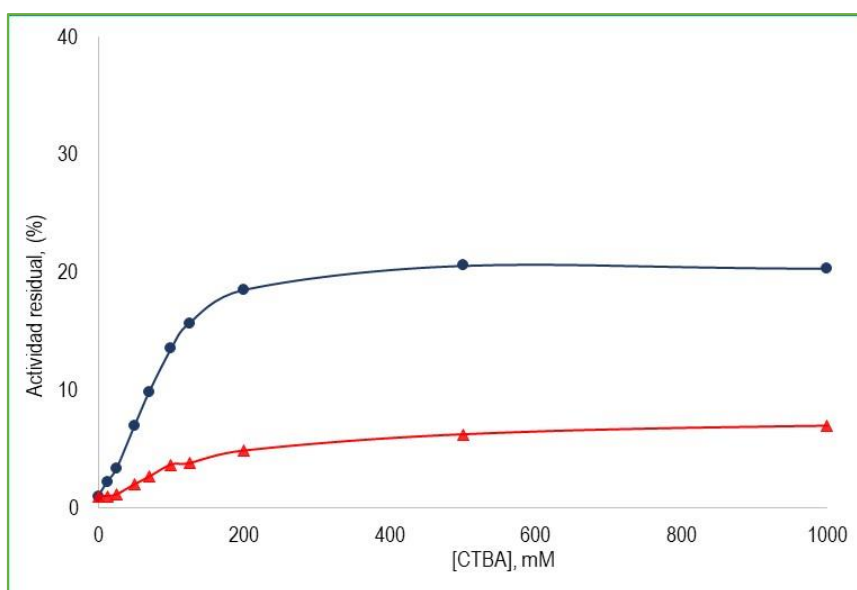


Figura 5.13 - Hiperactivación en presencia de detergente (CTAB) de los derivados de TLL inmovilizados covalentemente sobre agarosa activada con CNBr. La actividad en ausencia de CTAB es 1. Círculos: derivado del agregado bimolecular. Triángulos: derivado de la enzima aislada y cerrada.

El derivado del agregado bimolecular se hiperactiva hasta 20 veces con concentraciones de CTAB de 300 μ M. Así llegaba a tener la misma actividad que el derivado octil. En estas condiciones el agregado bimolecular parece que se transforma en dos moléculas hiperactivada, cada una de ellas 10 veces más activas que la enzima soluble.

Una interesante hiperactivación también se observó para el derivado covalente de la TLL unimolecular. Alcanzaba una hiperactivación de 7 veces respecto a la enzima soluble solo ligeramente inferior a la observada para el derivado bimolecular.

5.2.2. Temperatura óptima de las formas abierta y cerrada de TLL

La forma cerrada unimolecular de la TLL inmovilizada presenta una temperatura óptima de 40 °C. Por el contrario, la forma abierta sobre el soporte hidrofóbico presenta una temperatura óptima de 70 °C. La forma abierta parece mucho más termoestable que la forma cerrada. El derivado covalente del agregado contaminado por cerca del 40% de enzima unimolecular presenta una temperatura óptima intermedia de 55°C.

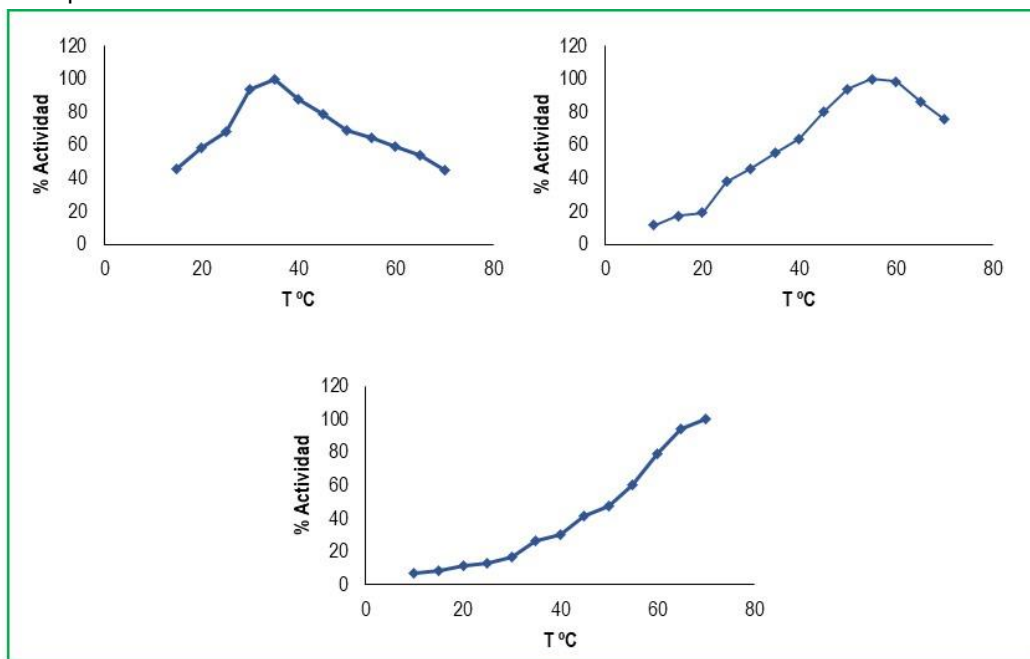


Figura 5.14 - Curvas actividad frente a temperatura. TLL-BRCN CTAB (enzima aislada y cerrada); TLL-BRCN sin CTAB (agregado bimolecular inmovilizado con un porcentaje de enzima aislada y cerrada); TLL-Octyl-Agarosa (enzima aislada y abierta adsorbida sobre soportes hidrofóbicos).

Ahora vamos a comprobar que la temperatura optima se corresponde a una mayor estabilidad frente a la inactivación térmica.

5.2.3. Curso de la inactivación térmica de vários derivados de TLL

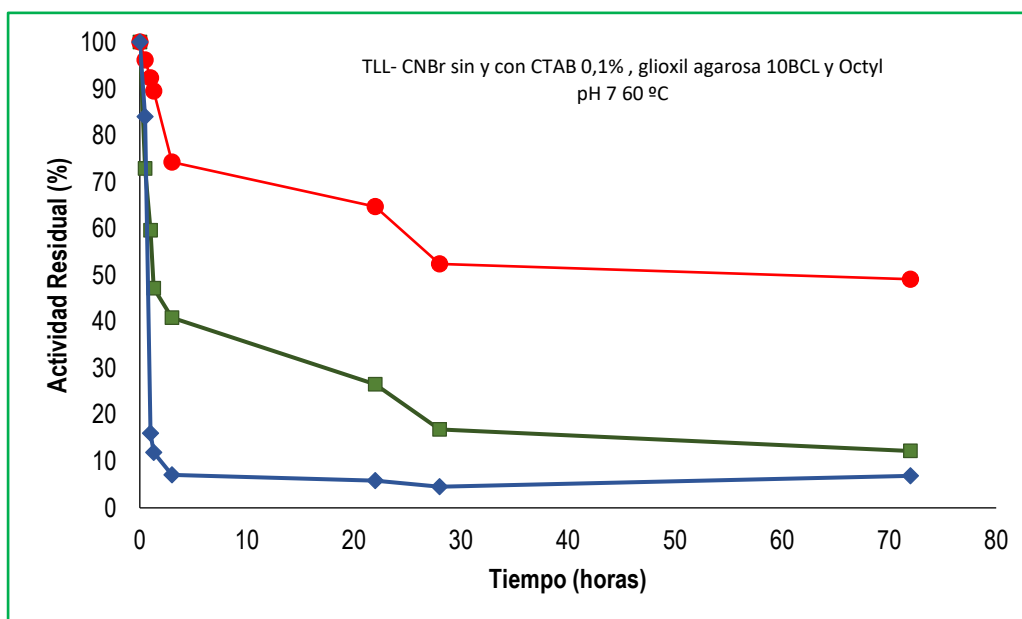


Figura 5.15 - Curso de inactivación térmica de diferentes derivados de TLL. Rojo: enzima aislada y abierta sobre octil-agarosa. Verde: agregado bimolecular con la forma abierta con un porcentaje de enzima aislada y cerrada; Azul: enzima aislada y cerrada.

El derivado de la forma unimolecular es el menos estable y viene a representar la inactivación intrínseca de la TLL. La TLL (en su forma cerrada y unimolecular) está fijada sobre el soporte y distante de cualquier otra molécula. Su inactivación representa la estabilidad térmica de la forma cerrada de la enzima nativa.

El derivado más estable es el formado por la forma abierta de la lipasas fijado y protegido por la superficie hidrofóbica del soporte (octil-TLL). El derivado covalente del agregado bi-molecular de la forma abierta cambien contiene un porcentaje importante de la forma unimolecular cerrada que es muy inestable. Por ello, su inactivación es claramente bifásica donde la fase más inestable corresponde al derivado unimolecular de la forma cerrada dela TLL y la fase más estable corresponde a la inactivación del agregado bimolecular de dos formas abiertas. Esta segunda fase es mucho más estable que el derivado covalente de la forma unimolecular cerrada.

5.2.4. Estabilización del derivado octil por recubrimiento con PAA

Al adsorberse al soporte octil todas las regiones expuestas de la enzima inmovilizadas son muy ricas en residuos carboxilo y se pueden recubrir fácil y muy sencillamente con polímeros catiónicos (polietilenimina (PEI) y polialilamina (PAA)). Los mejores resultados se obtuvieron con PAA y los derivados conservaban la hiperactivación y eran 5 veces más estables que el derivado octil sin modificar.

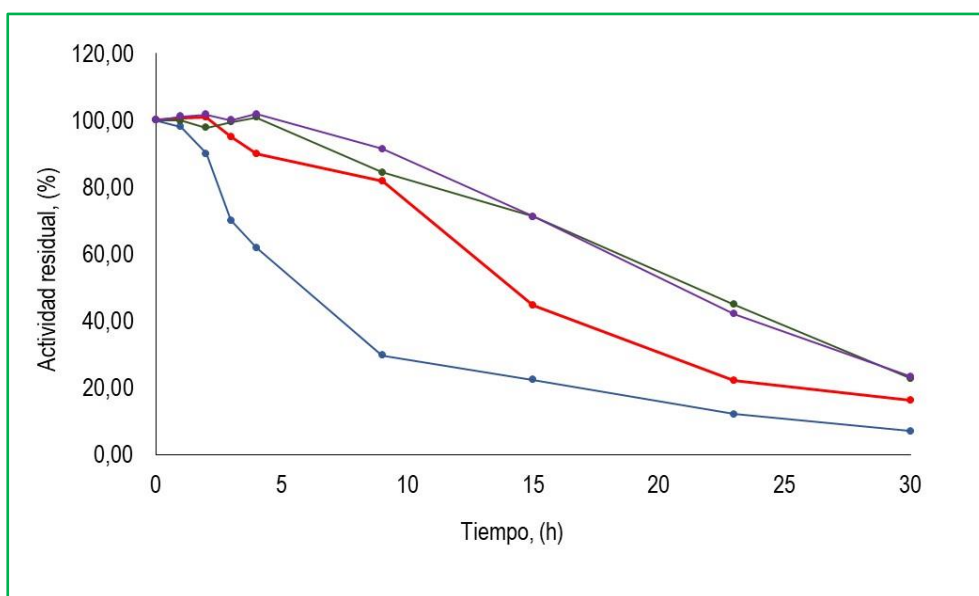


Figura 5.16 - Cursos de inactivación de derivados e TLL adsorbidos sobre octil-agarosa. Azul. Derivado sin recubrir, verde, rojo y morado: derivados recubiertos con distintas cantidades de poli-alil-amina.

Las estabilizaciones más importantes se resumen en la Tabla 5.2:

DERIVADO	ACTIVIDAD	FACTOR DE ESTABILIZACION
CNBr-CTAB	75	1
CNBR	50	100
OCTIL	1000	260
OCTIL + PAA	950	1800

Tabla 5.2 - Actividad y Factor de Estabilización de diferentes derivados de TLL. Actividad comparada con la enzima soluble. Estabilización: relación entre la vida media de cada derivado y la vida media de la enzima aislada y cerrada.

El derivado octil-PAA es 9,5 veces más activo que la enzima soluble nativa y 1800 veces más estable que la enzima nativa inmovilizada. Combinando las técnicas de inmovilización y post-inmovilización hemos conseguido prepara un derivado con excelentes propiedades de actividad y estabilidad.

5.2.5. Derivados de TLL inmovilizados sobre soportes poliméricos

Los derivados inmovilizados sobre soportes de PAA son bastante más estables que los derivados inmovilizados sobre soportes recubiertos de PEI. La PAA tiene muchos aminos primarios vecinales y esos podrían adsorber dos carboxilos muy próximos mejorando así su potencial estabilizante.

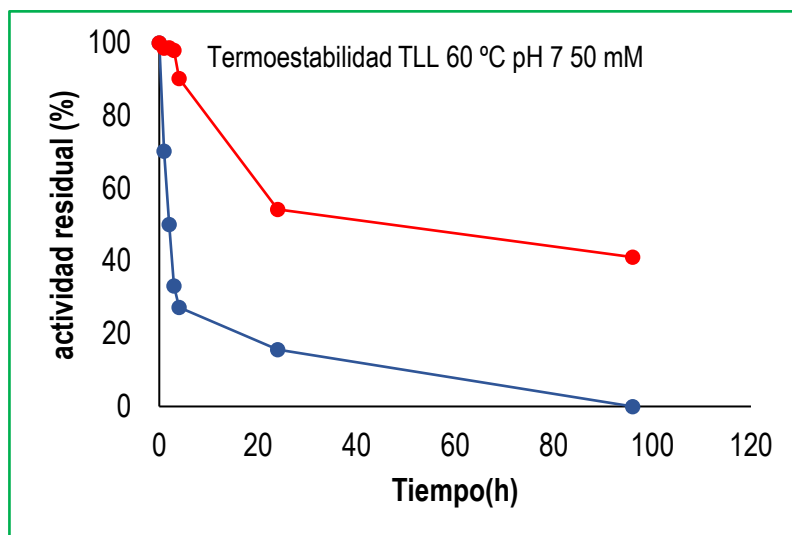


Figura 5.17 - Curso de inactivación de TLL inmovilizada sobre intercambiadores catiónicos. Rojo: inmovilizada sobre PAA; Azul: inmovilizada sobre PEI.

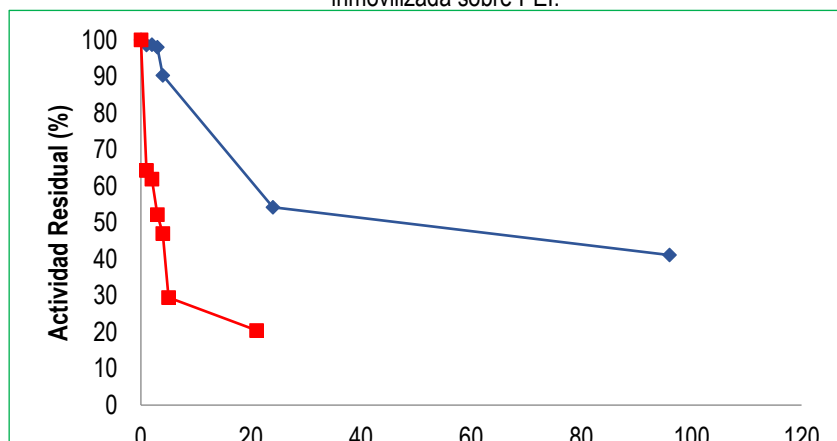


Figura 5.18 - Curso de inactivación de TLL adsorbida sobre PAA-agarosa. Azul: enzima inmovilizada en ausencia de CTAB; Rojo: enzima inmovilizada en presencia de CTAB.

En los dos casos, los derivados de los agregados bimoleculares son más estables que los derivados de la TLL unimolecular. Además, en los dos casos se observa que los derivados bimoleculares poseen un considerable porcentaje de la enzima sin asociar y por ello las inactivaciones son claramente bifásicas. Una primera parte inestable correspondiente a la enzima unimolecular y una segunda fase más estable correspondiente al derivado bimolecular.

5.2.6. Derivados de TLL sobre soportes catiónicos superficiales

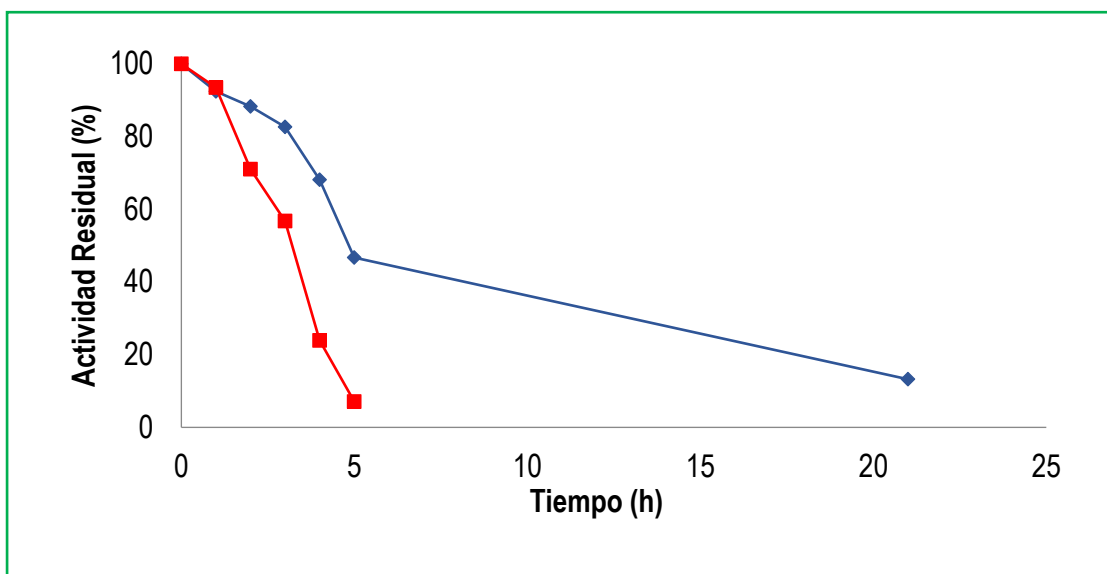


Figura 5.17 - Curso de inactivación de TLL inmovilizada sobre DEAE-agarosa y agarosa-Q. Rojo: inmovilizados en presencia de CTAB; Azul: inmovilizados en ausencia de CTAB.

Los dos derivados (sobre DEAE-SEPHAROSE y sobre SEPHAROSE-Q) tiene una estabilidad similar y en ambos casos se observa que los derivados del agregado bimolecular son más estables que los derivados de TLL unimolecular. Parecen menos estables que los derivados sobre soportes poliméricos tal como se reporta en el apartado siguiente.

5.2.7. Comparación de los derivados obtenidos por intercambio iónico

La estabilidad es similar pero los derivados obtenidos con PAA son bastante más estables, sobre todo la fase más lenta que corresponde al derivado unimolecular.

Estos derivados son muy fáciles de preparar, pero no exhiben Hiperactivación (octilTLL y octil) TLL +PAA) y son bastantes menos estables.

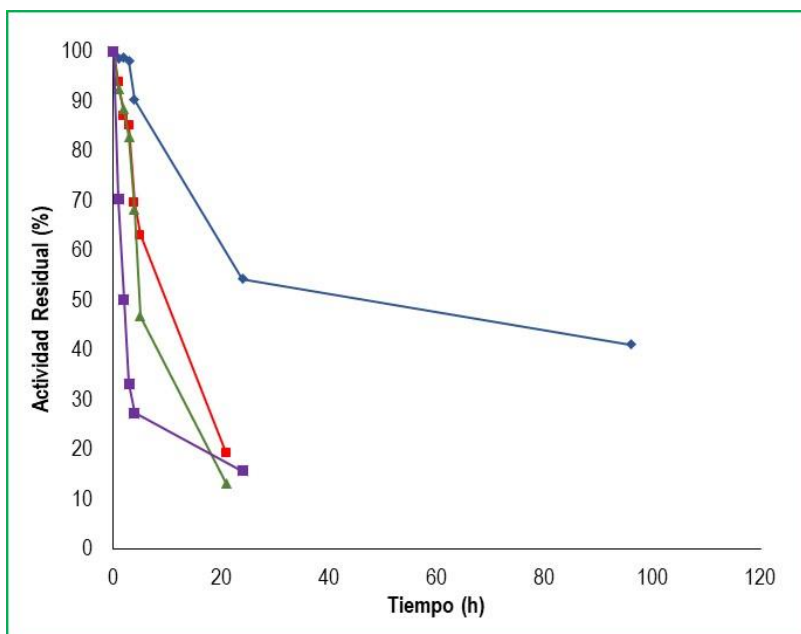


Figura 5.18 - Curso de inactivación de TLL adsorbida sobre diferentes intercambiadores aniónicos: Azul: PAA-agarosa; Rojo: PEI-agarosa; Verde: agarosa-Q; Morado: DEAE-agarosa.

5.2.8. Hidrolisis de aceites catalizada por los derivados inmovilizados

El estudio del hidrolisis de aceites nos permite observar la actividad de los derivados y la selectividad liberando distintos ácidos grasos contenidos en los aceites estudiados: El aceite de oliva contiene ácido oleico y linoleico y el aceite de sardina contiene dos ácidos grasos omega 3 (el eicosipentaenoico [EPA] y el docoxohexaenoico [DHA]).

DERIVADO	ACTIVIDAD, %	SELECTIVIDAD OLEICO / LINOLEICO
CNBr- CTAB	100	1,5
CNBr	80	2.0
OCTIL	400	2.0
DVB	200	2.0
PEI	70	0.8
PAA	60	0.7

Tabla 5.3 - Hidrolisis de aceite de oliva por derivados inmovilizados de TLL.

El derivado octil es de nuevo el más activo y los derivados menos activos son los preparados por intercambio iónico. Vamos ahora que los diferentes derivados muestran diferente selectividad. Los derivados de la forma abierta liberan ácido oleico dos veces más rápido que el ácido linoleico DHA y los derivados obtenidos por intercambio iónico liberan linoleico más rápidamente que el oleico. Las diferencias de selectividad son todavía mayores para la hidrólisis de aceite de sardina.

DERIVADO	SELECTIVIDAD EPA/DHA
CNBr-CTAB	6
CNBr	15
OCTIL	9
PEI - CTAB	2,5
PAA-CTAB	2,5

Tabla 5.4 - Hidrolisis de aceite de sardina por derivados inmovilizados de TLL.

De nuevo los derivados de la forma abierta (CNBr y octil) presentan una selectividad mucho mayor por EPA (15 y 9 veces) que los derivados de la forma cerrada sobre intercambiadores aniónicos (selectividad 2,5).

5.2.9. Conclusiones

Todos los derivados preparados fueron muy sencillos de preparar y se presentan diferentes propiedades de actividad, estabilidad y selectividad.

Los derivados de la forma abierta eran bastante más estables y más selectivos que los derivados de la forma cerrada.

Los agregados de dos formas activas no eran muy activos, pero se hiperactivaban 20 veces en presencia de pequeñas concentraciones de CTAB llegando a estar tan hiperactivados como los derivados de la forma abierta hiperactivada sobre el soporte octil.

El mejor derivado (octil recubiertos de PAA) era 9,5 más activo que la enzima soluble y 1800 veces más estable que la enzima cerrada y unimolecular inmovilizada.

Los derivados de la forma abierta liberaban EPA muy selectivamente con respecto al DHA durante la hidrólisis del aceite de sardina.

5.3. CAPTURA DE LOS AGREGADOS BIMOLECULARES POR TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN

5.3.1. Hipótesis de trabajo

En este capítulo intentamos desarrollar estrategias para capturar agregados bi-moleculares de lipasas con estructura abierta y para optimizar la preparación de derivados de lipasas mono-moleculares con estructura cerrada.

Nos planteamos la siguiente hipótesis:

- i. La unión covalente bipuntual a soportes glioxil forma enlaces estables pese a que la unión unipuntual forma enlaces muy inestables.
- ii. A pH 8,5 los únicos aminos capaces de inmovilizarse sobre grupos glioxil son los aminos terminales y en los agregados bimoleculares de TLL los dos aminos terminales están relativamente próximos.

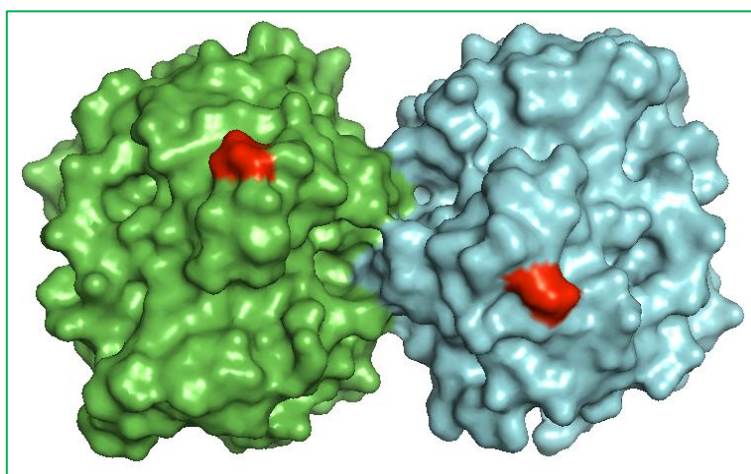


Figura 5.19 - Estructura cristalográfica del agregado bimolecular de TLL. Rojo: los residuos amino terminales.

- iii. La forma unimolecular de TLL (pe., la enzima soluble en presencia de altas concentraciones de CTAB) solo se inmoviliza sobre soportes glioxil en presencia de agentes estabilizantes de bases de Schiff (DTT, acetil cisteína, etc).

- iv. Usando soportes glioxil muy activados ambos procesos serán mucho más rápidos: la inmovilización espontanea del agregado bimolecular y la inmovilización de la forma unimolecular en presencia de agentes estabilizaciones.

5.3.2. Estabilización y fijación de los agregados bimoleculares por inmovilización espontanea sobre agarosa-glioxil

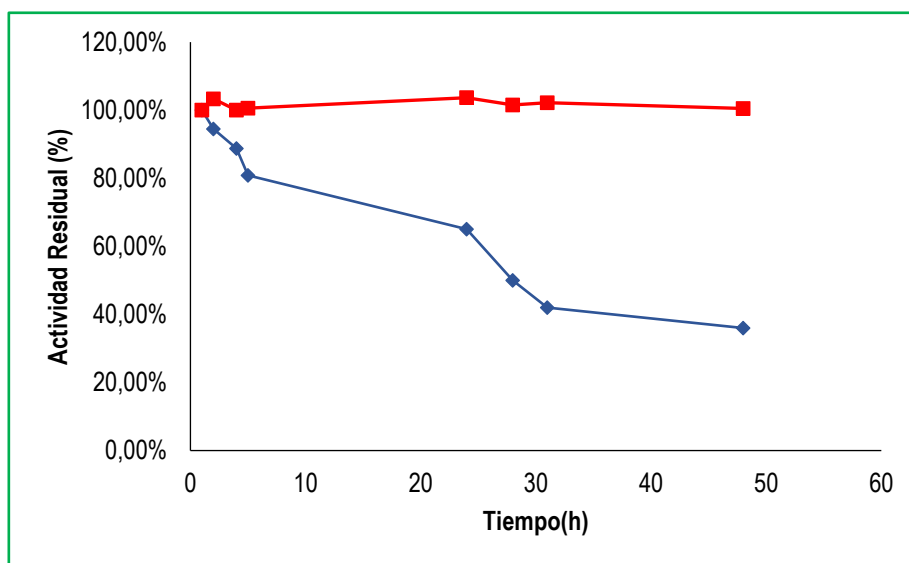


Figura 5.20 - Inmovilización espontanea del agregado bimolecular de TLL sobre geles glioxil-agarosa altamente activados. Azul: inmovilización de TLL en ausencia de CTAB (agregado bimolecular). Rojo: la enzima en presencia de CTAB (molécula aislada hiperactivada) no se inmoviliza.

En la figura observamos como el agregado bimolecular se inmoviliza perfectamente sobre un soporte glioxil altamente activado. Lógicamente solo se inmoviliza el porcentaje de enzima que forma agregados (un 65 % según los estudios de DLS) y el porcentaje de enzima no agregado no se inmoviliza ya que no puede formar enlaces bi-puntuales. Este método parece que nos permite purificar y fijar los agregados bimoleculares de TLL. La actividad del derivado era del 90% de la enzima inmovilizada.

En presencia de altas concentraciones de CTAB (pe, 0.5 %) casi toda la enzima TLL está en forma unimolecular y no se inmoviliza porque las uniones unipuntuales, en ausencia de agentes estabilizantes de bases de Schiff, son muy inestables.

5.3.3. Inmovilización de la enzima unimolecular en presencia de acetilcisteína como agente estabilizante de bases de Schiff

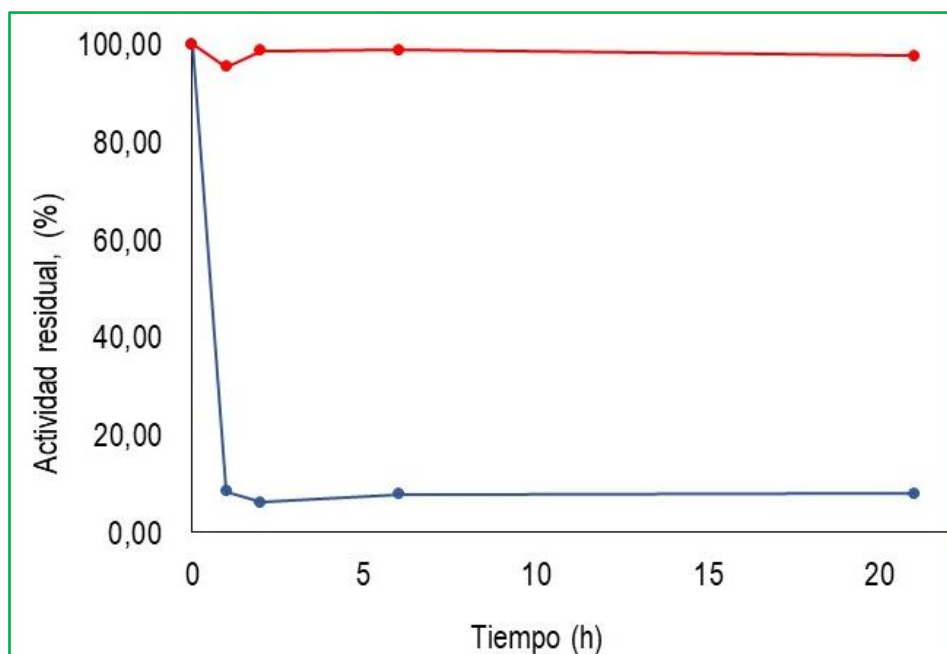


Figura 5.21 - Inmovilización de la enzima aislada de TLL en presencia de CTAB y acetil-cisteína sobre geles glioxil-agarosa altamente activados. Azul: inmovilización de la TLL en presencia de CTAB (forma aislada e hiperactivada) en presencia de acetil-cisteína (estabilizante de bases de Schiff), Rojo; inmovilización en ausencia de acetil-cisteína (la base de Schiff es muy inestable).

La inmovilización de la enzima disociada (en presencia de 0.5 % de CTAB) es muy rápida en presencia de 50 mM de acetil-cisteína y el blanco de la enzima soluble mantiene más del 90 % de actividad. Parece que efectivamente estamos inmovilizando la enzima a través de su único amino terminal que se transforma (después de la reducción con borohidruro sódico) en un grupo amino secundario. Estos derivados representarían los derivados inmovilizados de la enzima nativa (similar al derivado que obteníamos con agarosa activada con bromo-cianógeno (CNBR-Sepharosa). Ahora el enzima inmovilizado conserva el 100 % de su actividad catalítica.

5.3.4. Hiperactivación de derivados de TLL con CTAB

Estudiamos la Hiperactivación de TLL en presencia de diferentes concentraciones de CTAB

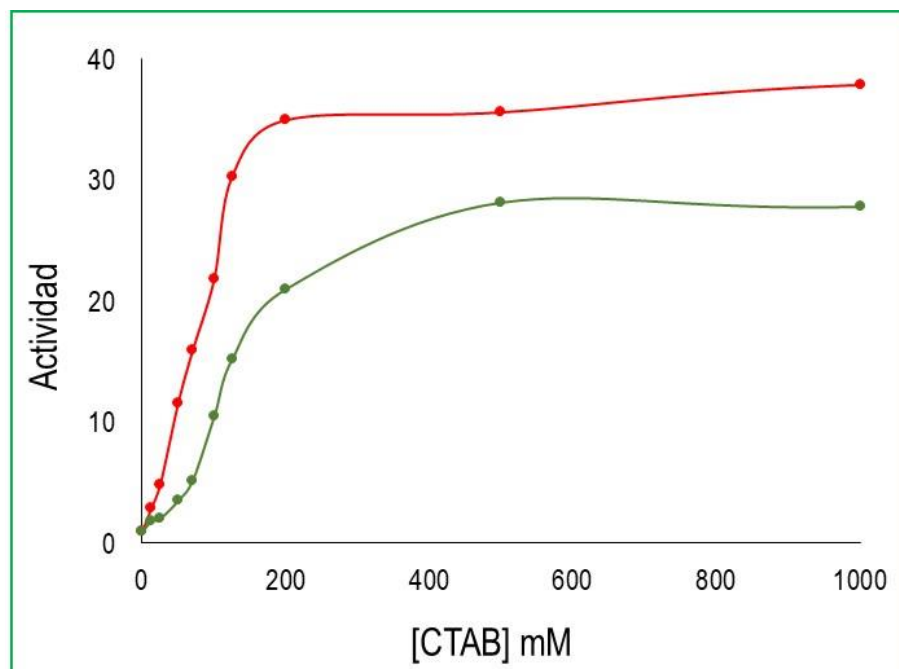


Figura 5.22 - Hiperactivación de derivados de TLL en presencia de diferentes concentraciones de CTAB. Verde: derivado de la enzima mono-molecular con la estructura cerrada. Rojo: derivado del agregado bimolecular con la estructura abierta.

Ambos derivados sufren una gran Hiperactivación. El derivado del agregado bimolecular se hiperactiva 37 veces e incluso se hace más activo de lo que habíamos observado previamente con el derivado octil-TLL. Parece que ambas hiperactivaciones (sobre un soporte sólido o por efecto del CTAB) son muy similares, pero no idénticas.

5.3.5. Temperatura óptima de los derivados inmovilizados

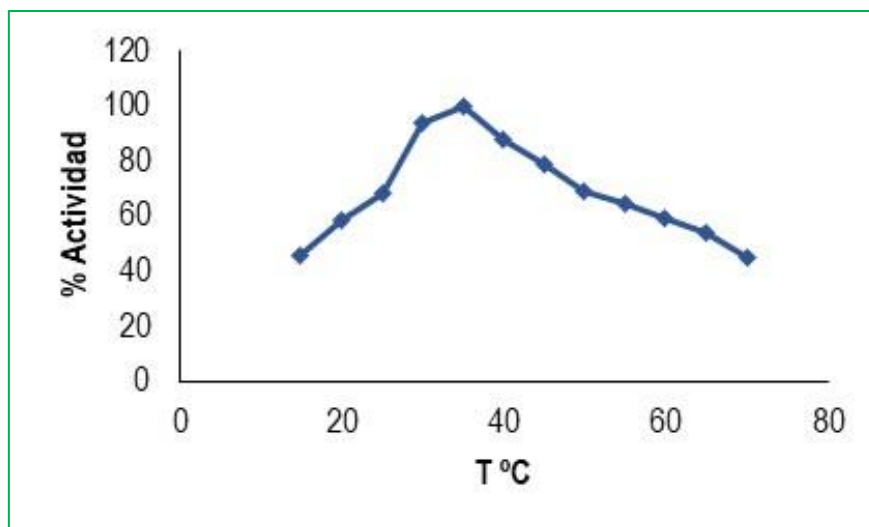


Figura 5.23 - Curva de actividad frente a temperatura para el derivado del agregado mono-molecular con la estructura cerrada.

La temperatura óptima del derivado monomolecular es prácticamente idéntica a la del derivado monomolecular obtenido sobre agarosa activada con CNBr. Alredor de 40 °C.

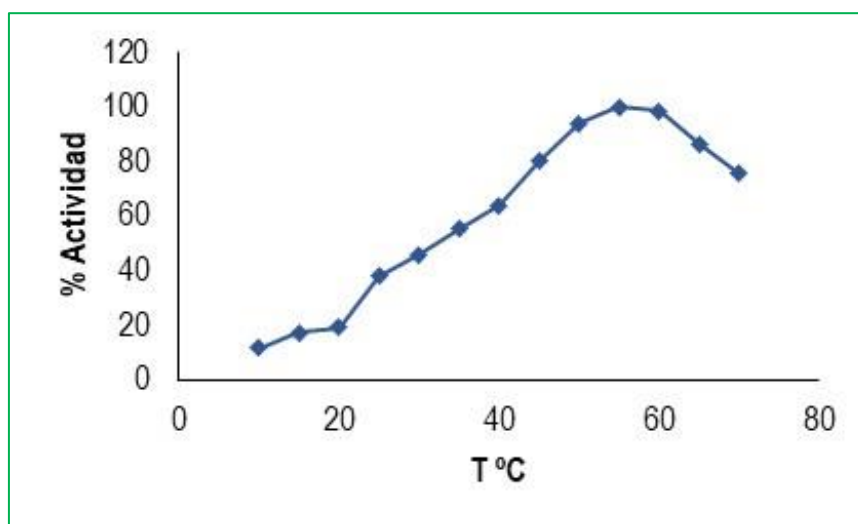


Figura 5.24 - Curva de actividad frente a temperatura para el derivado del agregado bi-molecular con la estructura abierta.

Sin embargo, el derivado bimolecular (sin contaminar por enzima aislada) presenta una temperatura óptima superior al derivado CNBr-TLL y prácticamente idéntica a la del derivado octil.

Parece que las dos formas abiertas de la TLL tienen la misma temperatura óptima. Está claro que la inmovilización espontánea de TLL en ausencia de CTAB es capaz de inmovilizar exclusivamente la forma de agregado bimolecular abierto de la enzima.

5.3.6. Curso de la inactivación térmica de los derivados inmovilizados de TLL

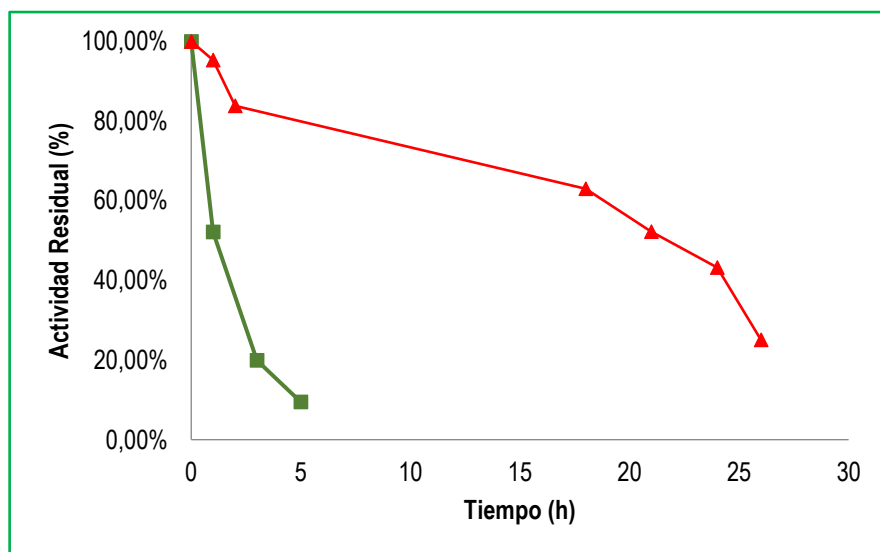


Figura 5.25 - Curso de inactivación térmica de derivados de TLL. Verde: derivado de la enzima aislada y cerrada: Rojo: derivado del agregado bimolecular con la estructura abierta.

En la figura observamos como el agregado bimolecular abierto es mucho más estable que el derivado unimolecular cerrado (unas 25 veces).

Además, el agregado bimolecular no presenta una inactivación bifásica ya que hemos purificado e inmovilizado únicamente el derivado bimolecular.

5.3.7. Conclusiones

Hemos sido capaces de preparar derivados bimoleculares de la forma abierta y derivados mono-moleculares de la forma cerrada

La estrategia propuesta nos permitió purificar el agregado bimolecular por inmovilización bipuntual sobre agarosa glioxil en ausencia CTAB. La única forma de la enzima capaz de unirse al soporte era la forma bimolecular de estructuras abiertas.

Los derivados se hiperactivaban hasta 37 veces en presencia de bajas concentraciones de CTAB.

La temperatura óptima de agregado era 30 grados superior a la temperatura del derivado unimolecular con estructura cerrada.

El curso de inactivación también mostraba que el derivado bimolecular de la estructura abierta era mucho más estable que el derivado unimolecular de la estructura cerrada.

5.3.8. Causas de la gran estabilidad de la unión bipuntual

La unión bi-puntual ocurre entre dos estructuras rígidas (la enzima y el soporte) que apenas pueden moverse una con respecto a la otra. De este modo la ruptura de un enlace amino-aldehído deja el grupo amino y el grupo aldehído extraordinariamente próximos y entonces volverán a reaccionar instantáneamente mucho antes de que se pueda romper el segundo enlace, tal como se muestra en la Figura 5.28.

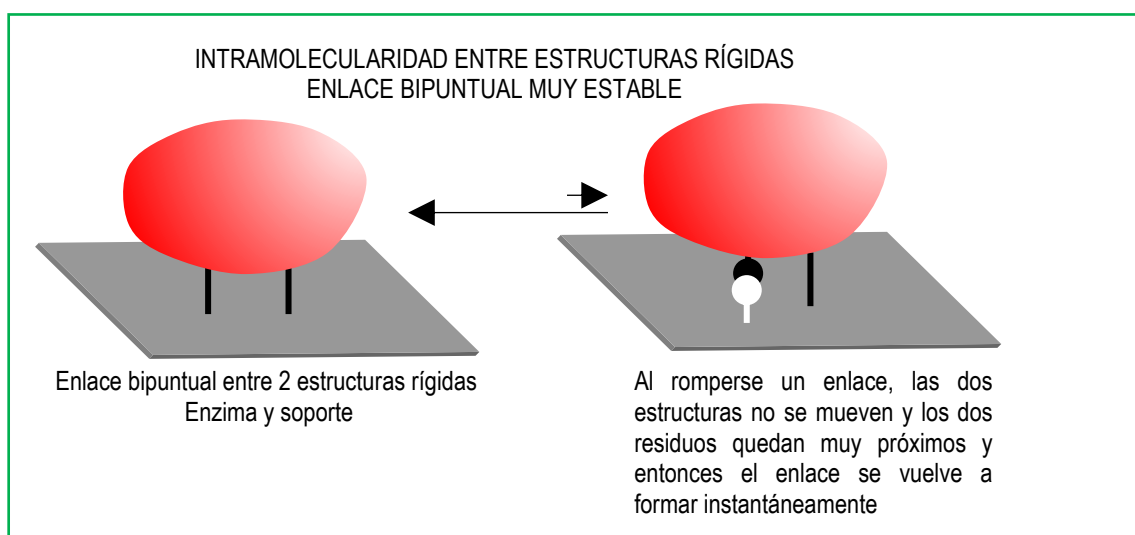


Figura 5.26 - Posible mecanismo de inmovilización bipuntual entre enzimas y soportes glioxil altamente activados.

5.4. CAPTURA DE LOS AGREGADOS BIMOLECULARES DE LIPASAS POR TECNICAS DE INMOVILIZACIÓN

5.4.1. Hipotesis de trabajo

Después de los interesantes resultados descritos en Capítulo 3 intentamos ahora aplicar la misma estrategia para capturar e inmovilizar agregados bimoleculares de la estructura abierta de otras lipasas, de *Candida antarctica* fracción B (CALB) y de *Rhizomucor miehei* (RML) y de una fosfolipasa (le LECITASA de Novozymes). Nos planteamos tres hipótesis principales:

1. La inmovilización de las enzimas sobre soportes glioxil a pH 8,5 solo inmoviliza el porcentaje de agregados bimoleculares presentes en la disolución enzimática porque ellos son capaces de inmovilizarse por unión covalente bipuntual.
2. En presencia de 0,5 % de CTAB o 0.5 % de TRITON (todo el agregado queda disociado) la enzima aislada no se inmoviliza sobre glioxil agarosa a pH 8.5. Solo hay un amino terminal por molécula y este no se une a un grupo aldehído. La unión unipuntual forma una base de Schiff muy inestable.
3. En presencia de 0,5 % de CTAB o TRITON y en presencia de un agente estabilizante de bases de Schiff (pe., 50 mM de acetil-cisteína) toda la enzima aislada se puede inmovilizar sobre el soporte glioxil altamente activado a pH 8,5, aunque se forma una única base de Schiff, ésta queda estabilizada por la N-acetil cisteína.

5.4.2. Agregados Bimoleculares de RML

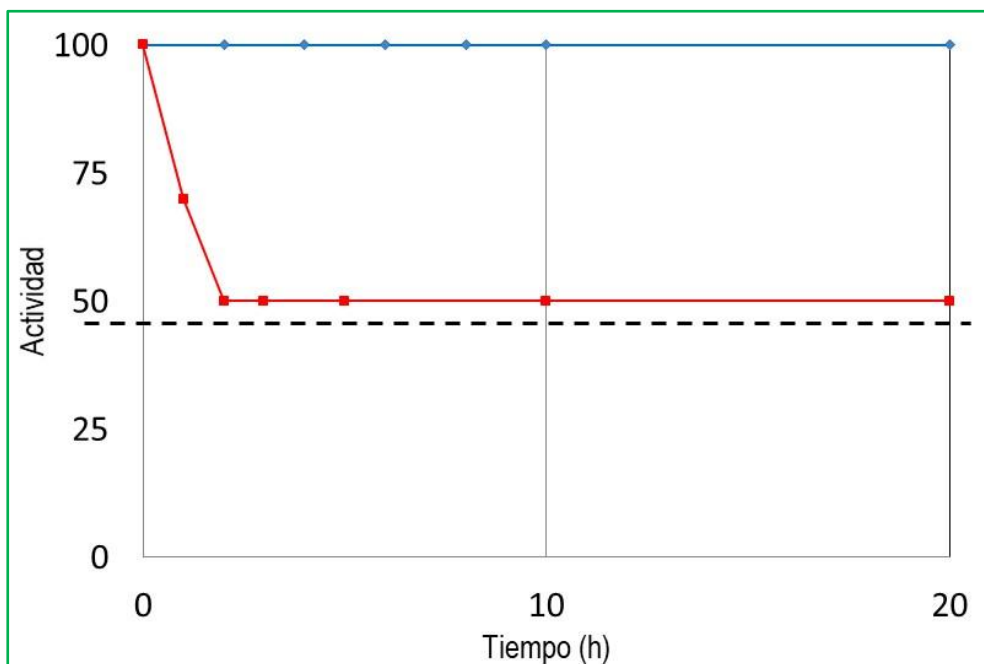


Figura 5.27 - Inmovilización de RML sobre soportes glioxil altamente activados. Rojo: en ausencia de triton (agregado bimolecular), Azul: en presencia de 0,5 % de triton (enzima aislada).

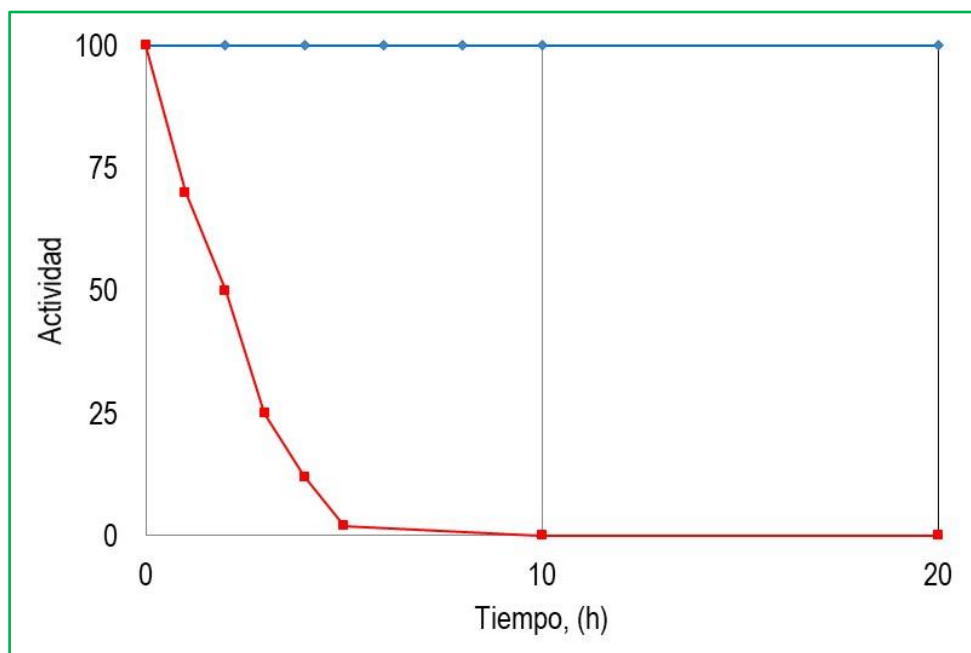


Figura 5.28 - Inmovilización de la enzima aislada de RML en presencia de TRITON. Rojo: en presencia de 50 mM de acetil-cisteína (estabilización de la base de Schiff entre la enzima y el soporte; Azul: en ausencia de acetil-cisteína.

5.4.3. Agregados Bimoleculares de CALB

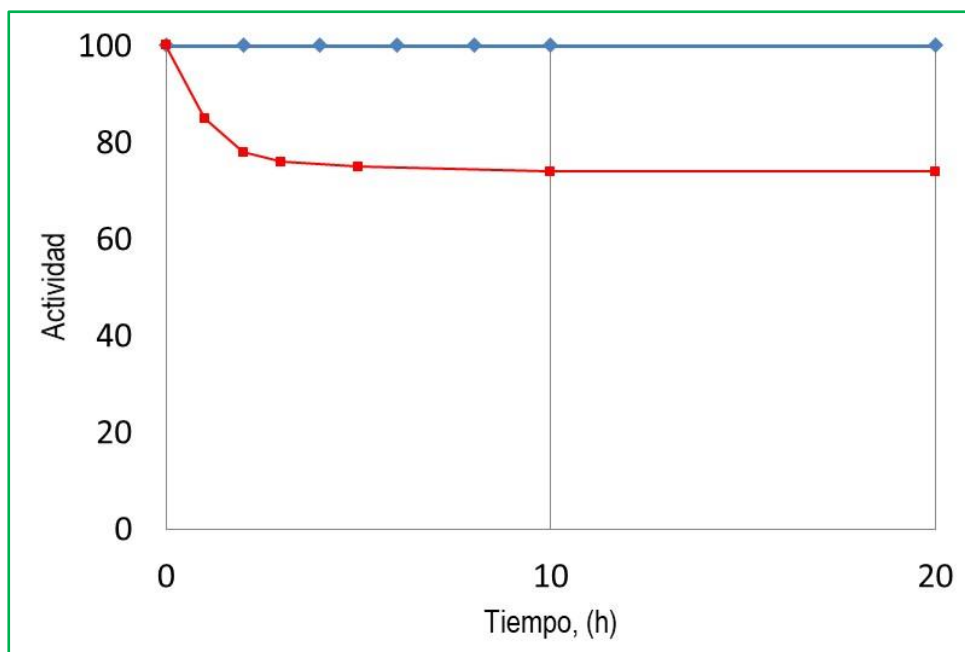


Figura 5.29 - Inmovilización de CALB sobre glioxil-agarosa, Rojo: en ausencia de TRITON, Azul: en presencia de TRITON.

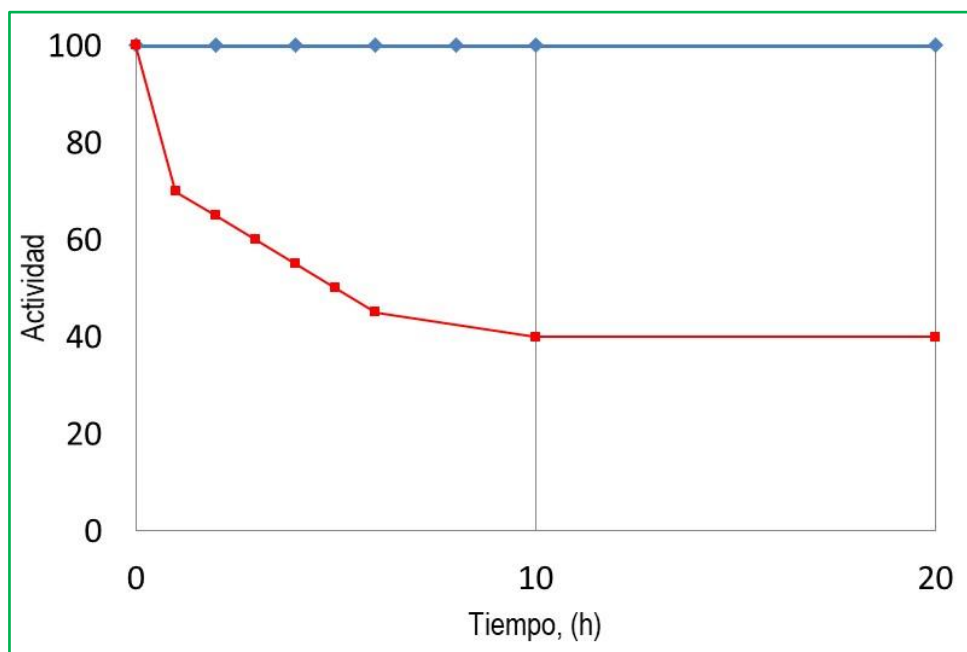


Figura 5.30 - Inmovilización de CALB en presencia de TRITON. Rojo: en presencia de acetil-cisteína; Azul: en ausencia de acetil-cisteína.

5.4.4. Agregados Bimoleculares de LECITASA

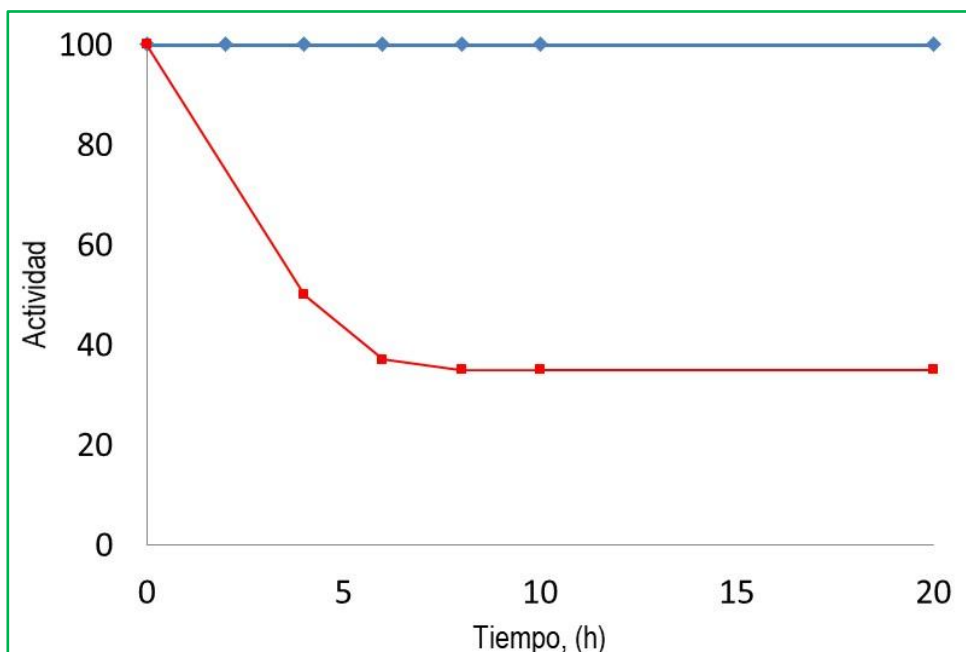


Figura 5.31 - Inmovilización de Lecitasa sobre soportes glioxil-agarosa. Rojo: en ausencia de CTAB, Azul: en presencia de CTAB.

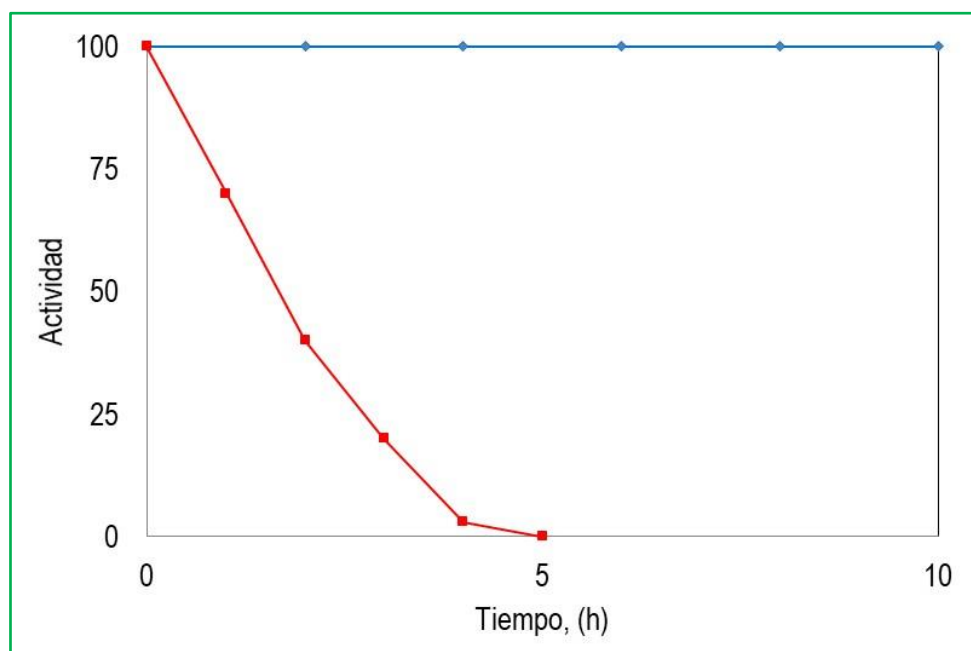


Figura 5.32 - Inmovilización de Lecitasa en presencia de CTAB. Rojo: en presencia de acetil-cisteína; Azul: en ausencia de acetil-cisteína.

En todos los casos la enzima sin surfactantes (mayoritariamente asociada) se inmoviliza sobre glioxil, pero solamente un porcentaje porque parte de la enzima soluble está dissociada y esa no se puede inmovilizar: se inmoviliza el 65 % de Lecitasa (muy similar a TLL), un poco menos (60%) de RML y mucho menos (un 25%) de CALB que debe ser la lipasa que menos se asocia. En todos los casos los agregados bimoleculares tienen los amino terminales próximos y pueden inmovilizarse por unión covalente bi-puntual, tal como comentamos en el capítulo 3.

Por otro lado, en presencia de surfactante y la enzima completamente dissociada no puede inmovilizarse covalentemente por unión unipuntual (una base de Schiff muy inestable)

Sin embargo, en presencia de N-acetil cisteína la inmovilización de la enzima es muy rápida y completa ya que la N-acetil cisteína estabiliza una sola base de Schiff entre la enzima y el soporte.

De este modo se pudieron inmovilizar los agregados bimoleculares de la enzima y se pudo inmovilizar la enzima aislada hiperactivada. Esta última, después de lavar el surfactante, se convierte en la enzima inmovilizada aislada y mayoritariamente con la estructura cerrada a la que denominamos enzima inmovilizada nativa.

5.4.5. Estabilidad térmica de los Agregados Bimoleculares

ENZIMA	Factor de estabilización de los diferentes derivados inmovilizados		
	Aislada y cerrada	Aislada y abierta	Bimolecular y abierta
	Enzima nativa inmovilizada	Enzima adsorbida sobre octil-agarosa	Agregado bimolecular inmovilizado sobre glioxil en ausencia de surfactante
TLL	1	360	20
LECITASA	1	4	100
RML	1	50	10
CALB	1	10	3

Tabla 5.5 - Los derivados se inactivan a pH 7.0 y a 60 °C (TLL, LECITASA y CALB) y a 50°C (RML). A diferentes tiempos se toman muestras de la suspensión y se analiza su actividad remanente. La vida media era el tiempo que tarda cada derivado en alcanzar el 50 % de actividad residual. El factor de estabilización de cada derivado se calculó dividiendo su vida media por la vida media del derivado de la enzima nativa.

En la Tabla 5.5 se observa que todos los derivados de la forma abierta de las enzimas eran bastante más estables que el derivado de la forma cerrada. En general los derivados adsorbidos sobre octil-agarosa eran los más estables, destacando el derivado de TLL que era 360 veces más estable que la enzima nativa inmovilizada. Curiosamente, el derivado octil de la Lecitasa se estabilizaba poco (4 veces) y en cambio el agregado bimolecular capturado por técnicas de inmovilización era 100 veces más estable que la enzima nativa inmovilizada.

5.4.6. Conclusiones

Tanto el desarrollo de técnicas de captura de agregados como las técnicas de inmovilización de la enzima nativa, nos permiten diseñar derivados más estables de todas las lipasas. Quizás sería muy interesante evaluar la estabilidad de estos derivados en medios orgánicos: disolvente polares, apolares o los propios sustratos para reacciones libres de disolventes.

6. CONCLUSIONES

A modo de resumen de esta Tesis doctoral quisiéramos resaltar las siguientes conclusiones:

1. Las lipasas solubles están mayoritariamente agregadas y por ello sus propiedades de actividad y estabilidad no representan las propiedades de las moléculas de lipasa aislada.
2. Estos agregados se rompen en presencia de surfactantes y ello parece indicar que son agregados bi-moleculares donde los centros activos abiertos e hidrofóbicos de dos moléculas de lipasa están unidos entre sí.
3. Los derivados de TLL preparados en presencia del surfactante CTAB sobre geles glioxil-agarosa a pH 8,5 en presencia de agentes estabilizantes de bases de Schiff (DTT, mercaptoetanol o acetil cisteína) se modifican únicamente por el amino terminal y representan las propiedades de la enzima aislada. En presencia de surfactante con su forma abierta y una vez eliminado el surfactante en su forma cerrada y aislada (la verdadera lipasa nativa inmovilizada).
4. En general, todos los derivados preparados sin surfactantes contienen un elevado porcentaje de agregados bimoleculares. Los derivados preparados en presencia de surfactante contienen mayoritariamente moléculas de lipasa aisladas.
5. Se prepararon diferentes derivados de TLL con y sin detergente CTAB y se estudiaron sus propiedades de actividad y estabilidad.
6. La inmovilización de TLL sobre soportes hidrofóbicos (octil-agarosa). Nos permite aumentar drásticamente su actividad catalítica (10 veces). La forma abierta de cada molécula aislada se hiperactiva y se fija sobre el soporte hidrofóbico.
7. Los derivados más estables fueron también los derivados TLL-octil agarosa y eran 360 veces más estables que la enzima aislada inmovilizada.
8. Los derivados TLL-octil se estabilizaban 5 veces más (hasta 1800 veces) cuando se recubrían con un polímero policatiónico (la polialilamina). Se estudió la quimio-selectividad de los diferentes derivados: relación EPA /DHA durante la hidrólisis de aceite de sardina. Se observó una diferencia significativa y los valores más significativos se obtuvieron para los derivados de la forma abierta (selectividad EPA/DHA de 15-9), Por el contrario los derivados de la forma cerrada la selectividad era mucho menor: alrededor de 2,5.
9. La inmovilización covalente sobre soportes glioxil en ausencia de detergente y en ausencia de agentes estabilizantes de bases de Schiff nos permite fijar y purificar los

agregados bimoleculares ya que solo estos pueden formar dos enlaces simultáneos de dos aminos terminales (uno de cada molécula del agregado) sobre dos grupos aldehído en el soporte.

10. Se pudieron capturar agregados bimoleculares de TLL, RML CALB, *Lecitasa* con porcentajes inmovilidades del 65, 60, 25 y 65 %. También se logró la inmovilización de la enzima aislada como la estructura mayoritariamente cerrada (enzima nativa inmovilizada).
11. Las formas abiertas de lipasas eran mucho más estables que las formas cerradas. La mayor estabilización fue octil TLL que era 360 veces más estable que la enzima nativa inmovilizada.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abreu Silveira, E., Moreno-Perez, S., Basso, A., Serban, S., Pestana Mamede, R., Tardioli, P. W., Sanchez Farinas, C., Rocha-Martin, J., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. 2017. "Modulation of the regioselectivity of *Thermomyces lanuginosus* lipase via biocatalyst engineering for the Ethanolysis of oil in fully anhydrous medium." *BMC Biotechnology* 17 (1): 88.

Abreu Silveira, E., Moreno-Perez, S., Basso, A., Serban, S., Pestana-Mamede, R., Tardioli, P. W., Farinas, C. S., Castejon, N., Fernandez-Lorente, G., Rocha-Martin, J., Guisan, J. M. 2019. "Biocatalyst engineering of *Thermomyces Lanuginosus* lipase adsorbed on hydrophobic supports: Modulation of enzyme properties for ethanolysis of oil in solvent-free systems." *Biotechnol* 289 126-134.

Adlercreutz, P. Immobilisation and application of lipases in organic media (2013) Chemical Society Reviews, 42 (15), pp. 6406-6436.

Anastas, P.T., Kirchhoff, M.M. (2002) "Origins, current status, and future challenges of green chemistry" Accounts of Chemical Research, 35 (9), pp. 686-694.

Anastas, P., Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice (2010) Chemical Society Reviews, 39 (1), pp. 301-312.

Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S., Ananthanarayan, L. Glucose oxidase - An overview (2009) Biotechnology Advances, 27 (4), pp. 489-501.

Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet, J., Guisán, J.M. 1998. "A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports." *Biotechnology and Bioengineering*, 58 (5) 486-493.

Bhosale, S.H., Rao, M.B., Deshpande, V.V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase (1996) Microbiological Reviews, 60 (2), pp. 280-300.

Blanco, R.M., Guisán, Jose, M. 1989. "Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels: Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives." *Enzyme and Microbial Technology*, 11 (6) 360-366.

Blanco, R.M., Calvete, J.J., Guisán, J.M. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment (1989) *Enzyme and Microbial Technology*, 11 (6), pp. 353-359.

Brady, D., Jordaan, J. Advances in enzyme immobilisation (2009) *Biotechnology Letters*, 31 (11), pp. 1639-1650.

Bryan, P., Pantoliano, M.W., Quill, S.G., Hsiao, H.Y., Poulos, T. Site-directed mutagenesis and the role of the oxyanion hole in subtilisin (1986) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (11), pp. 3743-3745.

Bornscheuer, U.T., Huisman, G.W., Kazlauskas, R.J., Lutz, S., Moore, J.C., Robins, K. 2012. "Engineering the third wave of biocatalysis." *Nature*, 485 (7397) 185-194.

Borrelli, G.M., Trono, D. 2015. "Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications." *International Journal of Molecular Sciences* 20774-20840.

Cao, L., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase (2000) *Organic Letters*, 2 (10), pp. 1361-1364. Cited 393 times.

Carrera, G., Riva, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents (2000) *Angewandte Chemie - International Edition*, 39 (13), pp. 2226-2254.

Choi, J.-M., Han, S.-S., Kim, H.S. 2015. "Current status and future aspects." *Biotechnology Advances*, 33 (7) 1443-1454.

Di Cosimo, R., Mc Auliffe, J., Poulou, A.J., Bohlmann, G. 2013. "Industrial use of immobilized enzymes." *Chemical Society Reviews*, 42 (15) 6437-6474.

Dias, F. R. F., Ferreira, V. F., Cunha, A. C. 2012. "An Overview of the Different Types of Catalysts in Organic Synthesis." *Revista Virtual de Química* 4 (6).

Dordick, J.S. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvent (1989) *Enzyme and Microbial Technology*, 11 (4), pp. 194-211.

Draper, S.R.E., Lawrence, P.B., Billings, W.M., Xiao, Q., Brown, N.P., Bécar, N.A., Matheson, D.J., Stephens, A.R., Price, J.L. Polyethylene Glycol Based Changes to β -Sheet Protein Conformational and Proteolytic Stability Depend on Conjugation Strategy and Location (2017) *Bioconjugate Chemistry*, 28 (10), pp. 2507-2513. Cited 5 times.

Dyal, A., Loos, K., Noto, M., Chang, S.W., Spagnoli, C., Shafi, K.V.P.M., Ulman, A., Cowman, M., Gross, R.A. Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles (2003) *Journal of the American Chemical Society*, 125 (7), pp. 1684-1685.

Eijssink, V.G.H., Bjørk, A., Gåseidnes, S., Sirevåg, R., Synstad, B., Burg, B.V.D., Vriend, G. 2004. "Rational engineering of enzyme stability." *Journal of Biotechnology*, 113 (1-3) 105-120.

Fang, X., Wang, X., Li, G., Zeng, J., Li, J., Liu, J. SS-mPEG chemical modification of recombinant phospholipase C for enhanced thermal stability and catalytic efficiency (2018) *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, pp. 1032-1039.

Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G., Guisán, J.M. 1998. "Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports." *Chemistry and Physics of Lipids*, 93 (1-2) 185-197.

Fernández-Lafuente, R. Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method (2003) *Biomacromolecules*, 4 (3), pp. 772-777

Fernández-Lorente, G., Pizarro, C., López-Vela, D., Betancor, L., Carrascosa, A. V., Pessela, B., Guisan, J. M. (2011). "Hydrolysis of Fish Oil by Lipases Immobilized Inside Porous Supports" *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88 (6): 819-826.

Fernandez-Lorente, G., Godoy, C. A., Mendes, A. A., Lopez-Gallego, F., Grazu, V., Rivas, D., Palomo, J. M., Hermoso, J., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. 2008. "Solid-Phase Chemical Amination of a Lipase from *Bacillus thermocatenulatus* To Improve Its Stabilization via Covalent Immobilization on Highly Activated Glyoxyl-Agarose." *Biomacromolecules* 9 (9) 2553-2561.

Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. 2001. "Biodiesel fuel production by transesterification of oils." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (5) 405-416.

- Fjerbaek, L., Christensen, K.V., Norddahl, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification (2009) *Biotechnology and Bioengineering*, 102 (5), pp. 1298-1315.
- Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B.D. Application of conducting polymers to biosensors (2002) *Biosensors and Bioelectronics*, 17 (5), pp. 345-359.
- Guisan, J. M. 2006. "Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins." *Humana Press* 1-13.
- Guisan, J., Sabuquillo, P., Fernandez-Lafuente, R., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Halling, P., Kennedy, D., Miyata, E., Re, D. 2001. "Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: Adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11 817-824.
- Guisán, J.M. 1988. "Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes." *Enzyme and Microbial Technology*, 10 (6) 375-382.
- Guisan, J.M., López-Gallego, F., Bolivar, J.M., Rocha-Martín, J., Fernandez-Lorente, G. 2020. "The Science of Enzyme Immobilization." *Methods in Molecular Biology*, 2100 1-26.
- Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., Wojcieszynska, D. 2014. "Immobilization as a strategy for improving enzyme properties- Application to oxidoreductases." *Molecules*, 19 (7) 8995-9018.
- Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E. Understanding enzyme immobilisation (2009) *Chemical Society Reviews*, 38 (2), pp. 453-468.
- Hudson, S., Cooney, J., Magner, E. Proteins in mesoporous silicates (2008) *Angewandte Chemie - International Edition*, 47 (45), pp. 8582-8594.
- Iyer, P.V., Ananthanarayan, L. 2008. "Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment." *Process Biochemistry*, 43 (10) 1019-1032.
- Jaeger, K.-E., Reetz, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology (1998) *Trends in Biotechnology*, 16 (9), pp. 396-403.
- Jeanne Perry, L., Wetzel, R. Disulfide bond engineered into T4 lysozyme: Stabilization of the protein toward thermal inactivation (1984) *Science*, 226 (4674), pp. 555-557

Kim, J., Jia, H., Wang, P. Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells (2006) *Biotechnology Advances*, 24 (3), pp. 296-308 Kurinomaru, T., Shiraki, K. 2015. "Noncovalent PEGylation of L-asparaginase using PEGylated polyelectrolyte." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104 (2) 587-592.

Klibanov, A.M. Stabilization of Enzymes against Thermal Inactivation (1983) *Advances in Applied Microbiology*, 29 (C), pp. 1-28.

López-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Alonso, N., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. 2005. "Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: A simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase." *Biomacromolecules*, 6 (4) 1839-1842.

López-Gallego, F., Fernandez-Lorente, G., Rocha-Martín, J., Bolivar, J.M., Mateo, C., Guisan, J.M. 2020. "Multi-Point Covalent Immobilization of Enzymes on Glyoxyl Agarose with Minimal Physico-Chemical Modification: Stabilization of Industrial Enzymes." *Methods in Molecular Biology*, 2100 93-107.

Mateo, C., Abián, O., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M. 2000. "Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment." *Enzyme y Microbial Technology* 26 509-515.

Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. 2000. "Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites." *Biotechnology and Bioengineering*, 68 (1) 98-105.

Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Rocha-Martin, J., Bolivar J. M., Guisan, J. M. 2013. "Oriented covalent immobilization of enzymes on heterofunctional-glyoxyl supports." *Springer* 73-88.

Mateo, C., Grazu, V., Palomo, J. M., Lopez-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. 2007b. "Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports." *Nature Protocols* 2 (5) 1022.

Mateo, C., Palomo, J. M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., López-Gallego, F., Pessela, B. C., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R. 2006. "Glyoxyl agarose: a fully inert

and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins.” *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2) 274-280.

Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. 2007a. “Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.” *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (6) 1451-1463.

Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Cortés, E., García, J.L., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M. One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-his-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports (2001) *Biotechnology and Bioengineering*, 76 (3), pp. 269-276. Cited 89

Mateo, C., Torres, R., Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Hidalgo, A., López-Gallego, F., Abian, O., Palomo, J.M., Betancor, L., Pessela, B.C.C., Guisan, J.M., Fernández-Lafuente, R. Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method (2003) *Biomacromolecules*, 4 (3), pp. 772-777.

Mateo, C., Bolivar, J.M., Godoy, C.A., Rocha-Martin, J., Pessela, B.C., Curiel, J.A., Muñoz, R., Guisan, J.M., Fernández-Lorente, G. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports (2010) *Biomacromolecules*, 11 (11), pp. 3112-3117.

Miyazaki, K., Takenouchi, M., Kondo, H., Noro, N., Suzuki, M., Tsuda, S. Thermal stabilization of *Bacillus subtilis* family-11 xylanase by directed evolution (2006) *Journal of Biological Chemistry*, 281 (15), pp. 10236-10242. Cited.

Morawski, B., Quan, S., Arnold, F.H. Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae* (2001) *Biotechnology and Bioengineering*, 76 (2), pp. 99-107.

Moreno-Pérez, S., Orrego, A.H., Romero-Fernández, M., Trobo-Maseda, L., Martins-Deoliveira, S., Munilla, R., Fernández-Lorente, G., Guisan, J.M. Intense PEGylation of Enzyme Surfaces: Relevant Stabilizing Effects (2016) *Methods in Enzymology*, 571, pp. 55-72. Cited 20 times.

Moreno-Perez, S., Filice, M., Guisan, J. M., Fernandez-Lorente, G. 2013. "Synthesis of ascorbyl oleate by transesterification of olive oil with ascorbic acid in polar organic media catalyzed by immobilized lipases." *Chemistry and physics of lipids* 174 48-54.

Moreno-Pérez, S., Luna, P., Señorans, F. L., Guisán, J. M., Fernandez-Lorente, G. 2015. "Enzymatic synthesis of triacylglycerols of docosahexaenoic acid: Transesterification of its ethyl esters with glycerol." *Food chemistry* 187 225-229.

Moreno-Perez, S., Turati, D. F. M., Borges, J. P., Luna, P., Señorans, F. J., Guisan, J. M., Fernandez-Lorente, G. 2017. "Critical Role of Different Immobilized Biocatalysts of a Given Lipase in the Selective Ethanolysis of Sardine Oil." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (1) 117-122.

Noureddini, H., Gao, X., Philkana, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil (2005) *Bioresource Technology*, 96 (7), pp. 769-777.

Ó'Fágáin, C. 2003. "Enzyme stabilization - Recent experimental progress." *Enzyme and Microbial Technology*, 33 (2-3) 137-149.

Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. immobilization and medium engineering: Hydrolytic resolution of mandelic acid esters (2002) *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (6), pp. 775-783.

Palomo, J. P., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Segura, R. L., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. (2006). "Purification, Immobilization, Hyperactivation, and Stabilization of Lipases by Selective Adsorption on Hydrophobic Supports" Humana Press 143-152

Palomo, J.M., Munoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases (2002) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19 (20), pp. 279-286.

Pantoliano, M.W., Ladner, R.C., Bryan, P.N., Rollence, M.L., Wood, J.F., Poulos, T.L. 1987. "Protein Engineering of Subtilisin BPN': Enhanced Stabilization through the Introduction of Two Cysteines to Form a Disulfide Bond." *Biochemistry*, 26 (8) 2077-2082.

Pedroche, J., del Mar Yust, M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., Guisán, J.M., Millán, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability (2007) *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (5), pp. 1160-1166.

Peñañiel, I., Cosgrove, S.C., Turner, N.J. 2019. "Biocatalysis Using Immobilized Enzymes in Continuous Flow for the Synthesis of Fine Chemicals." *Organic Process Research and Development*, 23 (1) 9-18.

Persson, B.A., Larsson, A.L.E., Le Ray, M., Bäckvall, J.-E. 1999. "Ruthenium- and enzyme-catalyzed dynamic kinetic resolution of secondary alcohols." *Journal of the American Chemical Society*, 121 (8) 1645-1650.

Pessela, B.C., Mateo, C., Fuentes, M., Vian, A., García, J.L., Carrascosa, A.V., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition: Complete hydrolysis of lactose in dairy products (2003) *Enzyme and Microbial Technology*, 33 (2-3), pp. 199-205. Cited 96.

Ranganathan, S.V., Narasimhan, S.L., Muthukumar, K. 2008. "An overview of enzymatic production of biodiesel." *Bioresource Technology*, 99 (10) 3975-3981.

Reetz, M.T. 2013. "Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: Past, present, and future." *Journal of the American Chemical Society*, 135 (34) 12480-12496.

Reichert, C., Borchard, G. (2016). Noncovalent PEGylation, An Innovative Subchapter in the Field of Protein Modification (2016) *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105 (2), pp. 386-390. Cited 15.

Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R. 2009. "Lipases at interfaces: A review." *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148 237-250.

Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, Å., Chapin, F.S., Lambin, E.F., Lenton, T.M., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H.J., Nykvist, B., De Wit, C.A., Hughes, T., Van Der Leeuw, S., Rodhe, H., Sörlin, S., Snyder, P.K., Costanza, R., Svedin, . 2009. "A safe operating space for humanity." *Nature*, 461 (7263) 472-475.

- Schoevaart, R., Wolbers, M.W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A.P.G., Van Rantwijk, F., Van Der Wielen, L.A.M., Sheldon, R.A. Preparation, optimization, and structures, of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) (2004) *Biotechnology and Bioengineering*, 87 (6), pp. 754-762.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. 2001. "Industrial biocatalysis today and tomorrow." *Nature*, 409 (6817) 258-268.
- Shan, C., Yang, H., Song, J., Han, D., Ivaska, A., Niu, L. 2009. "Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on graphene." *Analytical Chemistry*, 81 (6) 2378-2382.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases (2001) *Biotechnology Advances*, 19 (8), pp. 627-662.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., Tominaga, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase (1999) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 (7), pp. 789-793
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing (2002) *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 17 (3-5), pp. 133-142.
- Sheldon, R.A., Van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how (2013) *Chemical Society Reviews*, 42 (15), pp. 6223-6235. Cited 1310 times.
- Sheldon, R. (2001) "Catalytic reactions in ionic liquids." *Chemical Communications*, 1 (23), pp. 2399-2407.
- Sheldon, R.A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) (2011) *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92 (3), pp. 467-477.
- Sheldon, R.A. 2007. "Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): Stable and recyclable biocatalysts." *Biochemical Society Transactions*, 35 (6) 1583-1587.
- Sheldon, R.A. 2005. "Green solvents for sustainable organic synthesis: State of the art." *Green Chemistry*, 7 (5) 267-278.

Sheldon, R.A. 2007. "The quest for optimum performance." *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349 (8-9) 1289-1307.

Sheldon, R.A., Woodley, J.M. 2018. "Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry." *Chemical Reviews*, 118 (2) 801-838.

Stergiou, P.-Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L.G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A., Papamichael, E.M. 2013. "Advances in lipase-catalyzed esterification reactions." *Biotechnology Advances*, 31 (8) 1846-1859.

Stepankova, V., Bidmanova, S., Koudelakova, T., Prokop, Z., Chaloupkova, R., Damborsky, J. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents (2013) *ACS Catalysis*, 3 (12), pp. 2823-2836.

Strausberg, S.L., Alexander, P.A., Gallagher, D.T., Gilliland, G.L., Barnett, B.L., Bryan, P.N. 1995. "Directed evolution of a subtilisin with calcium-independent stability." *Biotechnology*, 13 (7) 669-673.

Trobo-Maseda, L., Orrego, A. H., Moreno-Pérez, S., Fernández-Lorente, G., Guisan, J. M., Rocha-Martin, J. 2018. "Stabilization of multimeric sucrose synthase from *Acidithiobacillus caldus* via immobilization and post-immobilization techniques for synthesis of UDP-glucose." *Applied microbiology and biotechnology* 102 (2) 773-787.

Valenzuela, A., Sanhueza Catalán, J., Nieto, S. 2006. "Docosaheaxanoic acid (DMA), essentiality and requirements: Why and how to provide supplementation." 57.

Verger, R. 1997. "Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts." *Trends in Biotechnology*, 15 (1) 32-38.

Vicente, G., Coteron, A., Martinez, M., Aracil, J. Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production (1998) *Industrial Crops and Products*, 8 (1), pp. 29-35.

Virgen-Ortíz, J. J., Santos, J. C., Berenguer-Murcia, Á., Barbosa, O., Rodrigues, R. C., Fernandez-Lafuente, R. 2017. "Polyethylenimine: a very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts." *Journal of Materials Chemistry B* 5 (36) 7461-7490.

Wang, J. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review (2005) *Electroanalysis*, 17 (1), pp. 7-14.

Wang, J. 2008. "Electrochemical glucose biosensors." *Chemical Reviews*, 108 (2) 814-825.

Wijma, H.J., Floor, R.J., Jekel, P.A., Baker, D., Marrink, S.J., Janssen, D.B. 2014. "Computationally designed libraries for rapid enzyme stabilization." *Protein Engineering, Design and Selection*, 27 (2) 49-58.

Yang, Z., Pan, W. 2005. "Enzyme and Microbial Technology, 37 (1)." *Enzyme and Microbial Technology*, 37 (1) 19-28.

Xavier Malcata, F., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill Jr., C.G., Amundson, C.H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-A review (1990) *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67 (12), pp. 890-910.

Xie, W., Huang, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto graphene oxide Fe₃O₄ nanocomposite: Characterization and application for biodiesel production (2018) *Energy Conversion and Management*, 159, pp. 42-53.

Xue, R., Woodley, J.M. Process technology for multi-enzymatic reaction systems (2012) *Bioresource Technology*, 115, pp. 183-195. Thompson, M.P.,

Zhao, Y.-Z., Yu, W.-L., Zheng, H., Guo, X., Guo, N., Hu, T., Zhong, J.-Y. PEGylation with the thiosuccinimido butylamine linker significantly increases the stability of haloalkane dehalogenase DhaA (2017) *Journal of Biotechnology*, 254, pp. 25-33. Cited 7 times.

Zhao, J., Lin, J.-D., Chen, J.-C., Chen, G., Li, X.-L., Wang, X.-Q., Chen, M.-X. α -chymotrypsin activated and stabilized by self-assembled polypseudorotaxane fabricated with bis-thiolated poly(ethylene glycol) and α -cyclodextrin: Spectroscopic and mechanistic analysis (2017) *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, pp. 1266-1273.

Zhou, M., Zhai, Y., Dong, S. Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide (2009) *Analytical Chemistry*, 81 (14), pp. 5603-5613.